

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Neuroscienze

XXX CICLO

**IL FLUIDO LACRIMALE DELLE FEMMINE INIBISCE IL
COMPORTAMENTO AGGRESSIVO NEL TOPO**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Vittorio Gallese

Tutor:

Chiar.mo Prof. Roberto Tirindelli

Dottoranda:

Rosa Maria Cavaliere

Anni 2014/2017

INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1.RIASSUNTO | 5 |
| 2.INTRODUZIONE | 7 |
| ✓ Il sistema olfattivo | 7 |
| ✓ Epitelio olfattivo principale (MOE) | 11 |
| ✓ Organo vomeronasale (VNO)..... | 13 |
| ✓ I semiochimici | 16 |
| ✓ Feromoni presenti nelle urine | 17 |
| ✓ Feromoni presenti nelle lacrime e nella saliva | 20 |
| ✓ L'attivazione dell'ipotalamo ventromediale stimola il comportamento aggressivo nel topo | 23 |
| 3.SCOPO DELLA TESI | 25 |
| 4.MATERIALI E METODI | 26 |
| ✓ Animali | 26 |
| ✓ Operazioni chirurgiche | 26 |
| ✓ Ovariectomia bilaterale..... | 26 |
| ✓ Castrazione di maschi CD1 | 27 |
| ✓ Asportazione delle ghiandole lacrimali extraorbitali | 27 |
| ✓ Prelievo del fluido lacrimale..... | 28 |
| ✓ Identificazione delle fasi del ciclo estrale della femmina..... | 28 |
| ✓ Dialisi | 29 |
| ✓ Test comportamentali | 30 |
| ✓ "Intermale-aggression test" | 30 |
| ✓ "Intermale aggression test" utilizzando maschi castrati come intrusi | 31 |
| ✓ Immunofluorescenza | 32 |
| ✓ Conta cellulare..... | 32 |
| ✓ Analisi statistica dei dati..... | 33 |
| 5.RISULTATI | 34 |
| ✓ Il fluido lacrimale come inibitore del comportamento aggressivo nei maschi..... | 34 |
| ✓ Le ovaie modulano la produzione di molecole inibitrici dell'aggressività | 40 |
| ✓ Il fluido lacrimale del maschio non incrementa il comportamento aggressivo | 43 |
| ✓ Caratterizzazione preliminare delle possibili dimensioni delle molecole inibenti l'aggressività..... | 46 |
| ✓ L'inibizione di specifiche regioni cerebrali è correlata ad una riduzione del comportamento aggressivo | 50 |
| ✓ Il fluido lacrimale della femmina attiva specifici nuclei del sistema abenulare..... | 54 |
| 6.DISCUSSIONE | 57 |
| 7.BIBLIOGRAFIA | 62 |

1.RIASSUNTO

In molti animali, i diversi comportamenti sociali, come l'aggressività e il comportamento sessuale, sono modulati da segnali chimici emessi da animali della stessa specie, definiti feromoni, che agiscono attraverso il sistema olfattivo. I feromoni sono contenuti in diversi fluidi corporei come l'urina, la saliva, secreti vaginali e lacrimali.

Dati presenti in letteratura mostrano che le lacrime del topo maschio rappresentano una grande sorgente feromonale in grado di modulare differenti comportamenti sociali, quali per esempio l'incremento dell'aggressività tra maschi e il comportamento recettivo nelle femmine. Poiché ad oggi non sono noti gli effetti comportamentali indotti dalle lacrime della femmina, nel mio progetto di dottorato, ho studiato l'influenza di questo fluido lacrimale sull'aggressività dei maschi.

A tale scopo il fluido lacrimale delle femmine è stato spennellato sulla regione dorsale, facciale e ano-genitale di un intruso prima di un test di aggressività tra maschi conspecifici.

I risultati mostrano che le lacrime delle femmine sono in grado di inibire in modo drammatico l'aggressività stimolando il comportamento sessuale e di investigazione.

Il ciclo estrale delle femmine non incide sulla produzione delle molecole inibitorie, tuttavia le ovaie risultano importanti per la secrezione di queste sostanze lacrimali.

Tentativi preliminari volti a caratterizzare la natura delle molecole inibitorie dimostrano che tali sostanze sono di basso peso molecolare e non volatili.

Data la natura non volatile di queste molecole è possibile supporre un coinvolgimento del sistema vomeronasale. Per questo motivo ho valutato l'attività neuronale delle aree cerebrali dell'asse vomeronasale implicate nell'induzione del comportamento aggressivo esponendo i residenti al fluido lacrimale di entrambi i sessi. I miei risultati mostrano un'elevata attivazione neuronale a livello dell'amigdala mediale (MeA) conseguente alla stimolazione con le lacrime sia di maschio che di femmina; tuttavia non è stato possibile identificare delle sotto regioni amigdaliche differenzialmente attive in seguito a stimoli sesso-specifici.

Differenze significative, invece sono state evidenziate a livello dell'area ventrolaterale dell'ipotalamo ventromediale (VMHvl), un sub-nucleo che riveste un ruolo centrale nella genesi del comportamento aggressivo.

I residenti esposti al fluido lacrimale di femmina presentano un numero ridotto di neuroni attivi a livello del VMHvl se confrontate con residenti esposti al fluido lacrimale del maschio.

Inoltre è stato interessante notare che il fluido lacrimale delle femmine determina l'inattivazione del nucleo dorsomediale dell'ipotalamo (DMH), un centro di regolazione di risposte neuroendocrine, cardiovascolari e fisiologiche legate allo stress. Viceversa, le lacrime della femmina attivano un'altra area cerebrale quale l'abenuola laterale generalmente coinvolta nella regolazione della valenza di un comportamento violento.

In conclusione, lo studio dimostra come il fluido lacrimale delle femmine riveste un ruolo centrale nella modulazione del comportamento aggressivo dei topi maschi. Questo avviene mediante l'attivazione di circuiti neuronali inibitori ed eccitatori che stimolano l'aggressività e l'aspetto motivazionale.

2.INTRODUZIONE

Il sistema olfattivo

In molte specie animali, i diversi comportamenti sociali sono modulati da segnali chimici, definiti feromoni, che agiscono attraverso il sistema olfattivo.

Negli organismi superiori, nonostante la chemiorecezione coinvolga sia gusto che olfatto, molti animali si affidano all'olfatto come principale modalità chemiosensoriale (Lledo et al., 2005).

Gli animali sono in grado di riconoscere e discriminare diversi tipi di odori presenti nell'ambiente che influenzano il loro comportamento e forniscono informazioni essenziali per la loro sopravvivenza (Dulac et al., 2006).

Il sistema olfattivo è infatti coinvolto in differenti meccanismi fisiologici, quali risposte emozionali (ansia, paura o piacere), il mantenimento dell'omeostasi, funzioni riproduttive (comportamenti sessuali o materni), e relazioni sociali (riconoscimento di individui della stessa specie o famiglia, ma anche le prede e predatori) (Lledo et al., 2005).

Nel topo (*Mus musculus*), tali funzioni sono regolate da due organi sensoriali anatomicamente differenti: il sistema olfattivo principale (MOS), costituito da epitelio olfattivo principale (MOE) e bulbo olfattivo principale (MOB), deputato al riconoscimento di molecole volatili; e il sistema olfattivo accessorio o sistema vomeronasale (VNS) suddiviso in organo vomeronasale (VNO) e bulbo olfattivo accessorio (AOB), specializzato nel rilevamento di una vasta gamma di molecole (volatili e non volatili) che una volta secreti regolano risposte fisiologiche e comportamentali (Figura 1).

Tali organi derivano da placodi olfattivi, ispessimenti che compaiono sull'ectoderma craniale di rivestimento in seguito alla chiusura del tubo neurale durante il processo embriogenetico.

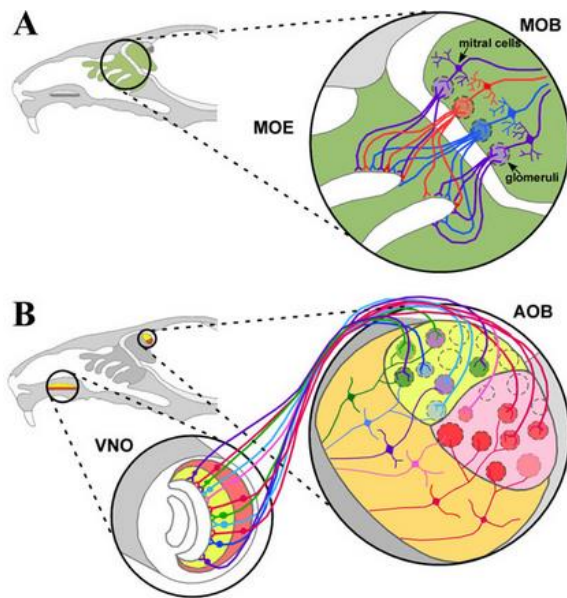


Figura 1: Rappresentazione del sistema olfattivo nel topo.

Abbreviazioni: bulbo olfattivo accessorio (AOB), bulbo olfattivo principale (MOB), epitelio olfattivo principale (MOE), organo vomeronasale (VNO). (modificato da **Dulac and Wagner 2006 Annu. Rev. Genet.; 40: 449–467**).

Per molto tempo, si è sostenuta l'ipotesi che i due sistemi chemiosensoriali, il sistema olfattivo principale e accessorio, fossero responsabili di differenti funzioni. Mentre il sistema olfattivo principale era ritenuto responsabile esclusivamente per il riconoscimento di molecole odorose convenzionali di tipo volatili, il sistema olfattivo accessorio, invece era ritenuto responsabile della percezione di feromoni e semiochimici prodotti da individui della stessa specie o di specie diverse (Ache and Young 2005; Dulac et al., 2003).

Sebbene i due sistemi differiscono per funzione ed anatomia, prove recenti dimostrano che entrambi i sistemi chemiosensoriali agiscono sinergicamente nella percezione degli odori. In questi sistemi i neuroni sensoriali ubicati nella cavità nasale esprimono distinte famiglie di recettori che rilevano i feromoni e innescano una cascata di eventi molecolari che, in ultima analisi, influenzano aspetti del comportamento sociale dell'individuo.

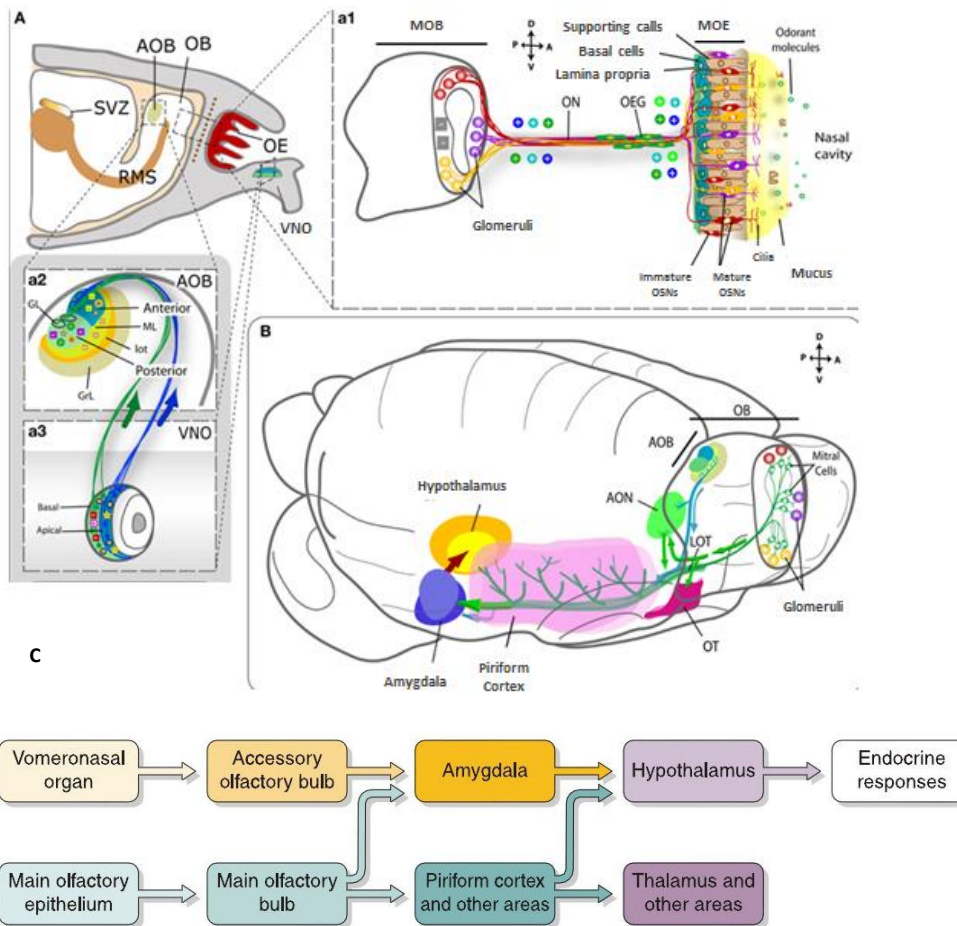


Figura 2: Schema rappresentativo delle proiezioni tra sistema olfattivo e aree cerebrali nel topo. (A) Rappresentazione schematica di una sezione sagittale del sistema olfattivo del topo (a2 e a3) mostra nel dettaglio le strutture del VNO e dell'AOB e le loro connessioni; (B) rappresentazione spaziale delle proiezioni dall' OB (in verde) e AOB (in blu) alle strutture riceventi della corteccia; (C) Diagramma schematico delle vie anatomiche dei sistemi olfattivi principale e accessorio nel topo. **Abbreviazioni:** AOB, bulbo olfattivo accessorio; AON, nucleo olfattivo anteriore; GL, strato glomerulare; GrL, strato granulare; LOT, tratto olfattivo laterale; ML, strato di cellule mitrali; OB, bulbo olfattivo; OE, epitelio olfattivo; ON, nervi olfattivi; OSN, neuroni olfattivi sensoriali; RMS, flusso migratorio rostrale; SVZ, zona subventricolare; OT, tubercolo olfattivo; VNO, organo vomeronasale. (modificato da Suárez Ret al., 2012 *Frontiers in neuroanatomy* 6, 50; Tirindelli et al., 2009 *Physiol Rev* 89: 921–956).

Anche se i due sistemi condividono un' organizzazione istologica simile essi mostrano delle differenze nel repertorio recettoriale e nelle vie di trasmissione a specifiche aree cerebrali (Figura 2C) (Munger et al., 2009).

Ogni sistema possiede un neuroepitelio costituito da neuroni sensoriali olfattivi primari i cui assoni inviano le informazioni ai neuroni di secondo ordine (cellule mitrali) del bulbo olfattivo principale (nel sistema olfattivo principale) o del bulbo olfattivo accessorio (nel sistema vomeronasale). Le proiezioni delle cellule mitrali del bulbo olfattivo principale giungono ai centri superiori tra cui la corteccia piriforme e l'amigdala corticale. Invece, le proiezioni del bulbo olfattivo accessorio giungono ai nuclei dell'amigdala mediale (o anche denominata amigdala vomeronasale), ai nuclei del letto della stria terminale (BNST) e al nucleo del tratto olfattivo accessorio (von Campenhausen et al., 2000; Dulac et al., 2006). Da qui le informazioni vengono trasmesse a livello ipotalamico (Lledo et al 2005; Tirindelli et al 2009; Baum et al 2012) (Figura 2B) dove regolano risposte neuroendocrine, fisiologiche e comportamentali. L'amigdala mediale rappresenta un centro importante per l'elaborazione delle informazioni provenienti dal sistema vomeronasale (Yang et al.,2014) che vengono trasmesse a livello dell'ipotalamo ventromediale (VMH) (Samuelsen et al.,2009; Swanson et al., 2000; Stowers et al.,2016) importante per la stimolazione dei diversi comportamenti sociali (come l'aggressività e la riproduzione) (Anderson., 2012; Yang et al.,2013; Unger et al.,2015; Lee et al.,2014). L' MeA e il VMH possono essere suddivisi in subnuclei anatomicamente distinti dove l'informazione viene elaborata stimolando differenti comportamenti sociali (Samuelsen et al., 2009; Swanson et al., 2000). Ad esempio le risposte difensive da odori dei predatori coinvolgono principalmente l'amigdala mediale ventrale e il dorsomediale del VMH (VMHdm); mentre le risposte comportamentali aggressive e riproduttive stimulate da feromoni invece, coinvolgono principalmente l'amigdala posteriore mediale e il venterolaterale del VMH (VMHvl).

Epitelio olfattivo principale (MOE)

Nei mammiferi l'evento iniziale della comunicazione olfattiva ha luogo nell'epitelio olfattivo, localizzato nell'estremità posteriore della cavità nasale e a diretto contatto con l'aria proveniente dall'esterno. L'epitelio olfattivo è un tessuto colonnare pseudostratificato che riveste strutture cartilaginee, dette turbinati, ed è costituito dalla ghiandola di Bowman e da tre tipi cellulari principali: i neuroni sensoriali olfattivi (OSN), cellule di sostegno e cellule staminali basali (Ronnett 2002) (Figura 2a1). I neuroni sensoriali olfattivi rappresentano 70 – 80 % della popolazione totale cellulare dell'epitelio olfattivo, dotati di capacità rigenerativa durante la vita dell'organismo, con una emivita di circa 60 – 90 giorni (Firestein 2001). Presentano morfologia bipolare con un unico dendrite disposto sulla superficie epiteliale, mentre i loro assoni si dipartono per prendere contatto con il bulbo olfattivo principale (Figura 3). Il dendrite termina con un'espansione globosa da cui si dipartono ciglia immerse nel muco delle cavità nasali. Il muco contiene proteine leganti gli odori (olfactory binding protein OBP) secrete dalla ghiandola di Bowman, con la funzione di legare molecole idrofobiche facendole passare in soluzione.

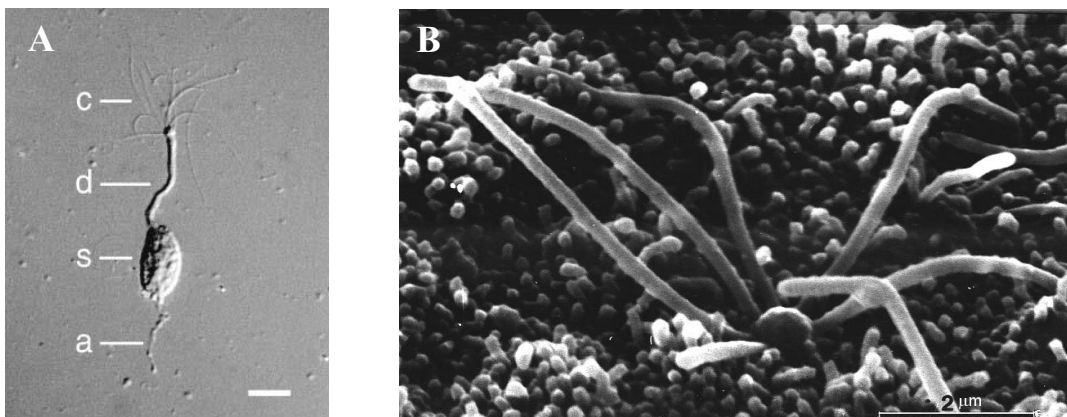


Figura 3: Immagine di microscopia elettronica a scansione del neurone olfattivo sensoriale in (A) (a – assone; s – soma; d – dendrite; c - ciglia); (B) ciglia dell'epitelio olfattivo.

I composti odoranti presenti nell'aria inalata si legano a specifici recettori sulle ciglia dei neuroni olfattivi, i cui assoni attraversano la lamina cribrosa proiettano al bulbo olfattivo in specifiche regioni denominate glomeruli, nelle quali formano sinapsi con le cellule mitrali (Figura 2 a1 e B).

I recettori olfattivi appartengono alla famiglia dei recettori a sette eliche transmembrinarie accoppiati a proteine G (GPCR, G protein-coupled protein) (Ronnelt et al 2007).

Sono costituiti da un dominio extracellulare, deputato al riconoscimento di odoranti, uno transmembranario e uno intracellulare importante per l'interazione con una proteina eterotrimerica formata da tre subunità α ($G\alpha_{olf}$) β e γ (Mombaerts 1999). Una volta che gli odori entrano nella cavità nasale, vengono disciolti nel muco che ricopre la superficie dell'epitelio olfattivo e si legano ai recettori olfattivi presenti sulle ciglia nei neuroni sensoriali olfattivi. Tale legame determina l'attivazione della proteina G stimolatoria Golf che a sua volta attiva l'adenilato ciclasi di tipo 3 (AC3) portando ad un aumento della concentrazione intracellulare di cAMP. Questi eventi determinano l'apertura dei canali "Cyclic Nucleotide Gated Channel Alpha 2" (CNGA2) che permettono l'ingresso di Ca^{2+} e di Na^{+} . L'aumento del Ca^{2+} intracellulare permette l'apertura dei canali per il Cl^{-} che fuoriesce dalla cellula determinando una forte depolarizzazione che porta all'insorgenza di un potenziale d'azione (Tirindelli et al 2009) (Figura 4).

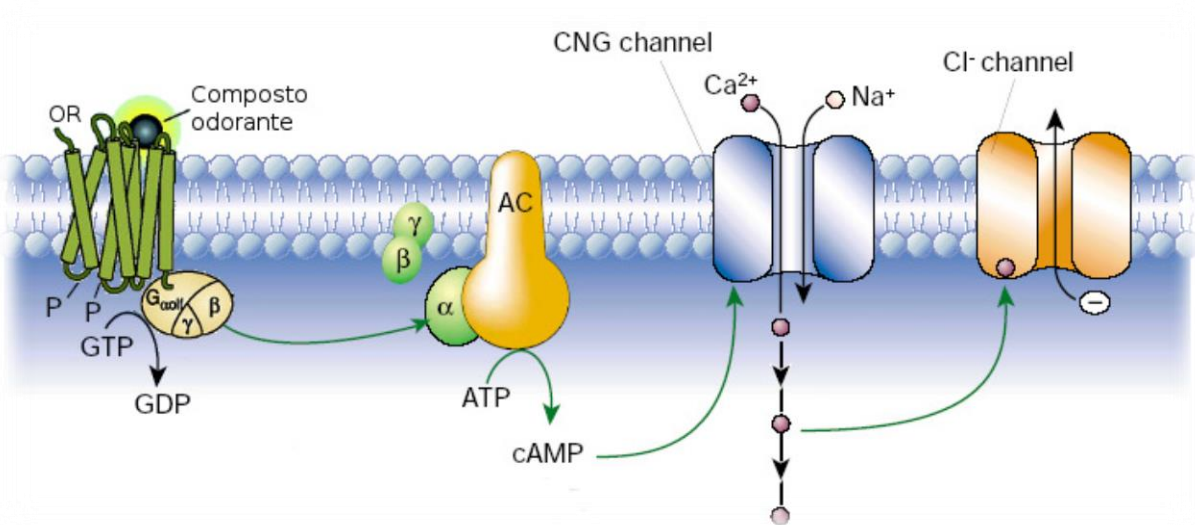


Figura 4: Schema rappresentativo del meccanismo di trasduzione del segnale del recettore presente a livello delle membrane delle ciglia dell'epitelio olfattivo (Firestein S. 2001. Nature 413 (6852):211 – 218).

Organo vomeronasale (VNO)

L'organo vomeronasale è una sottostruttura sensoriale del sistema olfattivo accessorio ed è costituito da neuroni chemiosensoriali deputati al riconoscimento di molecole odorose recanti informazioni sullo stato sociale dei conspecifici. Tale informazione viene trasmessa attraverso gli assoni dei neuroni sensoriali vomeronasali al bulbo olfattivo accessorio, che manda afferenze ai nuclei ipotalamici responsabili delle risposte neuroendocrine e comportamentali (Figura 2 a2; Figura 2B).

L'organo vomeronasale è una struttura bilaterale tubulare ubicata in una capsula di protezione ossea situata alla base del setto nasale. Si tratta di un organo chemorecettivo ricoperto da epitelio sensoriale e collegato alle cavità nasali mediante il dotto vomeronasale.

Data la sua localizzazione, non entra direttamente in contatto con il flusso d'aria che normalmente scorre nelle cavità nasali. Durante le indagini olfattive, i chemosegnali

che entrano in contatto con le cavità nasali vengono disciolti nel muco e tramite il dotto vomeronasale indirizzate nel lume dell'organo in seguito ad aspirazione (Trotier., 2011).

Il lume dell'organo vomeronasale, analogamente all'epitelio olfattivo principale, è rivestito da un neuroepitelio pseudostratificato composto da tre tipi di cellule: le cellule staminali basali, localizzate lungo la membrana basale dell'epitelio sensoriale; le cellule di sostegno che si trovano nello strato superficiale dell'epitelio sensoriale e i neuroni sensoriali vomeronasali (VSNs). I VSNs sono bipolari con un soma che separa un assone dal dendrite. Il dendrite è caratterizzato da una terminazione globulare con microvilli liberamente fluttuanti nel fluido mucoso del lume. A livello della membrana dei microvilli si riscontrano recettori accoppiati a proteine G, appartenenti a due grandi superfamiglie multigeniche denominate, V1R e V2R, distribuite rispettivamente sui neuroni della zona apicale e basale dell'epitelio sensoriale (Dulac and Axel, 1995; Herrada and Dulac, 1997; Matsunami and Buck, 1997; Ryba and Tirindelli, 1997). I loro assoni proiettano rispettivamente nello strato apicale e basale del bulbo olfattivo accessorio in grado di legare i feromoni diversi (Figura 2.a2,a3). I recettori V1R possono legare sia molecole non volatili che volatili (tra cui le piccole molecole volatili testosterone dipendente presenti nelle urine del maschio e steroidi solfati) (Leinders-Zufall et al., 2000), al contrario i neuroni che esprimono i recettori V2R vengono stimolati da una grande varietà di odoranti di tipo proteici e peptidici tra cui le “major urinary proteins” (MUP), peptidi del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) e gli “exocrine secreting peptides” (ESP) (Leinders-Zufall et al., 2004; Chamero et al., 2007; Kimoto et al., 2007). In questo modo, attraverso l'organo vomeronasale, gli animali percepiscono stimoli naturali presenti nei fluidi corporei che trasmettono informazioni sul sesso e sull'identità individuale (Holy et al., 2000; Kimoto et al., 2007; He et al., 2008, Nodari et al., 2008).

Il legame recettore–ligando attiva due proteine G, G α i2 e G α o, espresse rispettivamente nel lato intracellulare dei recettori V1R e V2R che determinano attivazione della fosfolipasi C (PLC), che porta alla scissione del fosfatidilinositolo in

inositolo 1,4,5 trifosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG). Mentre l'IP3 mobilita le riserve di calcio intracellulare, il DAG determinerà l'apertura di canali cationici denominati TRPC2 "transient membrane potential receptor", che causa a sua volta ingresso di calcio extracellulare. L'ingresso di ioni calcio scatena l'apertura di ulteriori canali ionici calcio dipendenti che determinano la depolarizzazione di membrana e di conseguenza la genesi del potenziale d'azione (Tirindelli et al 2009) (Figura 5).

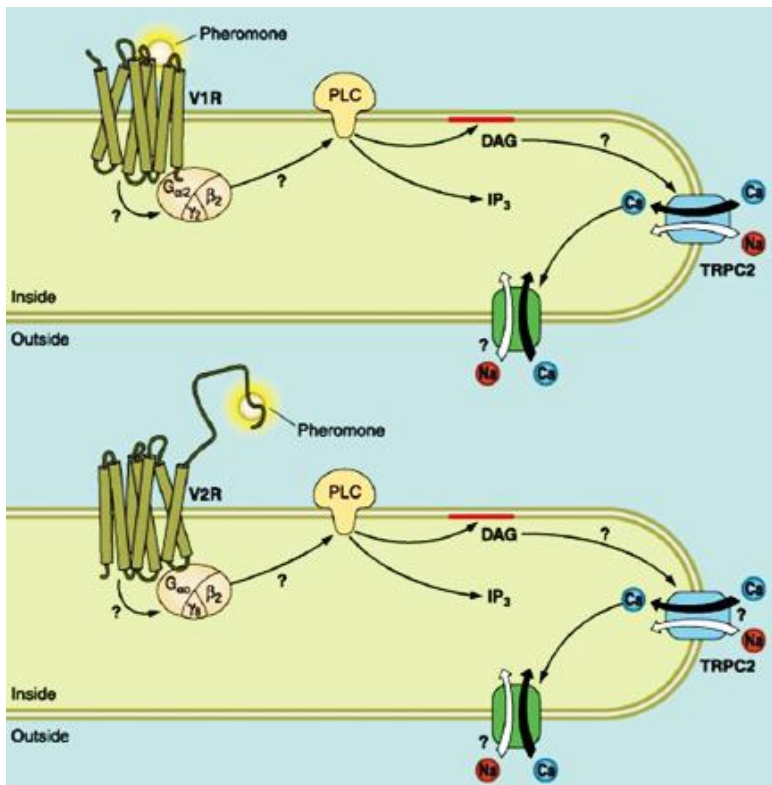


Figura 5: Modello di trasduzione del segnale nei neuroni del VNO (modificato da Tirindelli et al., 2009 *Physiol Rev* 89: 921–956).

I SEMIOCHIMICI

I mammiferi interagiscono mediante lo scambio di sostanze chimiche che vengono veicolate attraverso l'urina, la saliva, le lacrime, il fluido vaginale e i secreti ghiandolari.

Tali sostanze, sono denominate semiochimiche (da greco "semeion" che significa segno), le cui classi rappresentative sono: allelochimici e feromoni (Tirindelli et al 2009).

Gli allelochimici presentano un effetto interspecifico in quanto messaggeri chimici che agiscono tra specie diverse (Sbarbati et al., 2006). Si possono dividere in allomoni, cairomoni e sinomoni.

Gli allomoni sono secreti da un individuo a scopo difensivo, ne sono un esempio l'acido formico delle formiche e le sostanze repellenti delle cimici.

I cairomoni trasmettono informazioni utili per l'organismo ricevente (ad esempio, roditori che riescono a percepire molecole odorose emanate dai predatori).

Un'altra classe di semiochimici sono i feromoni (derivano dal greco "pherein" che significa trasportare e "hormon", eccitare), sono specifiche sostanze biologicamente attive, secrete da un individuo, in grado di stimolare in un conspecifico reazioni comportamentali, secrezioni ormonali e altre reazioni fisiologiche (Karlson et al 1959). Possono essere suddivisi in "releaser" e "primer" (McClintock MK.,1998). I "primer" inducono nel ricevente una risposta fisiologica mediate l'attivazione del sistema neuroendocrino. Ne sono un esempio "l'effetto Vandenberg" (feromoni maschili presenti nelle urine che stimolano il primo ciclo estrale in femmine prepuberali) o "l'effetto Whitten" (feromoni presenti nelle urine di maschio che stimolano la sincronizzazione del ciclo estrale in una popolazione di femmine) (Vandenberg., 1967; Whitten., 1956) I "releaser" invece, sono molecole importanti per il riconoscimento individuale ed evocano una risposta comportamentale come l'aggressività, l'accoppiamento e la marcatura del territorio.

Come spiegato in precedenza la comunicazione feromonale tra conspecifici viene modulata principalmente dal sistema vomeronasale; tuttavia anche l'epitelio olfattivo principale contribuisce in maniera determinante nella modulazione di risposte endocrine e comportamentali (Tirindelli et al., 2009; Kimchi et al., 2007; Stowers et al., 2002; Leypold et al., 2002). Infatti l'ablazione chirurgica o delezione genica di tali sistemi influenza una serie di comportamenti sociali, tra cui l'accoppiamento (Ferrero et al., 2013; Stowers et al., 2002), l'attrazione sociale (Oboti et al., 2014; Dey et al., 2015; Roberts et al., 2010), l'aggressività territoriale (Leypold et al., 2002; Mandiyan et al., 2005; Stowers et al., 2002; Matsuo et al., 2015; Chamero et al., 2011; Chamero et al., 2007), aggressività materna (Leypold et al., 2002; Chamero et al., 2011) e la dominanza gerarchica (Kaur et al., 2014).

Feromoni presenti nelle urine

Gli animali sfruttano differenti meccanismi per il rilascio di feromoni importanti per la comunicazione tra conspecifici. In molti casi avviene mediante l'escrezione di urina e feci che possono essere deliberatamente lasciati nell'ambiente come marchi territoriali. Sono note infatti le molecole contenute nelle urine in grado di modulare i diversi comportamenti sociali. Esse contengono una vasta gamma di molecole con funzione feromonale come piccole sostanze volatili così come solfati steroidei e proteine in grado di modulare il comportamento sessuale e aggressivo (Novotny 2003; Chamero et al., 2007; Nodari et al., 2008).

Infatti l'aggressività territoriale tra maschi della stessa specie rappresenta uno dei tanti comportamenti innati, che risulta modulata da proteine urinarie maschili.

Sono molecole con funzione feromonale che agiscono attraverso il sistema vomeronasale, stimolando comportamenti di attacco tra maschi conspecifici. Tali proteine prendono il nome di MUPs (major urinary proteins) e sono una grande famiglia di proteine omologhe sintetizzate nel fegato ed escrete attraverso le urine (Cavaggioni et al., 2000; Logan et al., 2008). Le MUPs appartengono alla

superfamiglia delle lipocaline e legano e rilasciano piccoli feromoni volatili (Bacchini et al., 1992; Bocskei et al., 1992). Le MUPs sono espresse nelle ghiandole esocrine come le ghiandole mammarie, parotide, sublinguali, submascellari, lacrimali, nasali e agiscono come feromoni “primer” o “relaaser” (Shahan et al.,1987). Le MUP legano feromoni volatili implicati nella sincronizzazione del ciclo estrale delle femmine (Jemiolo et al., 1986), induzione dell'estro (α - e β -farnesene) (Ma et al.,1998), aggressività tra maschi (Novotny et al., 1985) e per marcare il territorio (Beynon et al., 2004; Hurst et al., 2004).

Le MUPs prive di ligandi presentano funzione feromonale e attivano VSNs V2R situati nello strato basale del neuroepitelio del VNO (Chamero et al 2007, Chamero 2011; Papes et al., 2010).

Nelle urine del maschio sono contenute altre molecole con funzione feromonale come le α - e β -farneseni importanti per la marcatura del territorio (Novotny et al., 1990; Jemiolo et al., 1992) per l'induzione del ciclo estrale nelle femmine (Brennan et al., 2003, Dulac et al., 2003) e l'attrazione femminile (Jemiolo et al., 1991). Infatti, tali molecole, risultano maggiormente concentrate nelle urine dei maschi dominanti rispetto alle urine di topi subordinati e vengono prodotte a livello dei testicoli e dalle ghiandole prepuziali per azione testosterone dipendente (Novotny et al. , 1990).

Il 2-sec-butyl-4,5-diidrotiazolo (SBT) e il 3,4-deidro-exo-brevicomina (DHB) sono i costituenti urinari volatili nei topi maschi. Mediante castrazione la concentrazione di tali molecole si riduce drasticamente, mentre iniezioni di testosterone ripristinano la loro concentrazione a livelli fisiologici (Novotny et al., 1985). Sebbene una miscela di SBT e DHB non presenta carattere feromonale sulle femmine riceventi, tuttavia l'aggiunta di tali composti nelle urine di maschi castrati stimola l'attrazione delle femmine (Jemiolo et al., 1985) e la sincronizzazione del ciclo estrale (Jemiolo et al. , 1986). È possibile che nelle urine vi siano delle molecole peptidiche con funzione trasportatrice che permettono la trasmissione di SBT e DHB al VNO dove tali composti si legano su recettori situati nel neuroepitelio vomeronasale.

Il “(Methylthio) methanetiol” (MTMT) è esclusivamente presente nelle urine del maschio e risulta importante per segnalare la presenza di un maschio anche a lunga distanza (Alema et al., 1988; Lin et al., 2005). Tale composto agisce esclusivamente mediante attivazione del sistema olfattivo principale e risulta altamente volatile. Lo “(Z) -5-tetradecen-1-ol” (Z5-14: OH) è stato recentemente identificato come un ligando naturale per un recettore del MOB e viene escreto dalle ghiandole prepuziali nelle urine del maschio per azione testosterone dipendente e agisce come segnale per attirare le femmine ai fini riproduttivi (Yoshikawa et al., 2013).

Le urine di femmine invece, presentano molecole in grado di inibire l’aggressività, con incremento del comportamento sessuale, quando vengono spennellate sul dorso di un intruso durante un “intermale aggression test” (Dixon et al., 1971; Mugford et al., 1966).

Recentemente sono state identificate le prime molecole presenti nelle urine di femmina in grado codificare il sesso di un conspecifico attraverso il sistema vomeronasale. “Cortigynic acid” (M377) e “corticosteronic acid” (M361), in combinazione spennellate su femmine ovariectomizzate stimolano il comportamento di monta da parte del maschio durante un’interazione sociale. Tali sostanze risultano scarsamente presenti in femmine giovani o ovariectomizzate e completamente assenti nei maschi. Probabilmente tali sostanze mimano lo stato estrale della femmina che generalmente stimola il comportamento sessuale nel maschio (Fu et al., 2015).

Feromoni presenti nelle lacrime e nella saliva

Tra le proteine presenti nelle lacrime, si riscontrano peptidi appartenenti ad una famiglia multigenica, denominata “exocrine gland secreting peptides” (ESPs) (Kimoto et al 2005) che vengono sintetizzate da specifiche ghiandole lacrimali (Kimoto et al 2007) (Cavaliere et al 2014). È una famiglia multigenica di peptidi di peso molecolare variabile (7-10 KDa) costituita da 38 geni nel topo, 10 nel ratto e assenti nell’uomo. I

geni che codificano per i peptidi ESP, sono presenti in un cluster sul cromosoma 17, in una regione telomerica di 3,2 Mb rispetto ai loci del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I), la cui numerazione aumenta in direzione del centromero (Figura 6).

È interessante notare un gruppo molto grande di geni che codificano per i recettori olfattivi (OR) interposto tra il cluster MHC I e quello ESP (Figura 6). Il cluster dei geni OR presentano sovrapposizione con la regione MHC I, mentre risultano chiaramente separati i cluster OR e ESP.

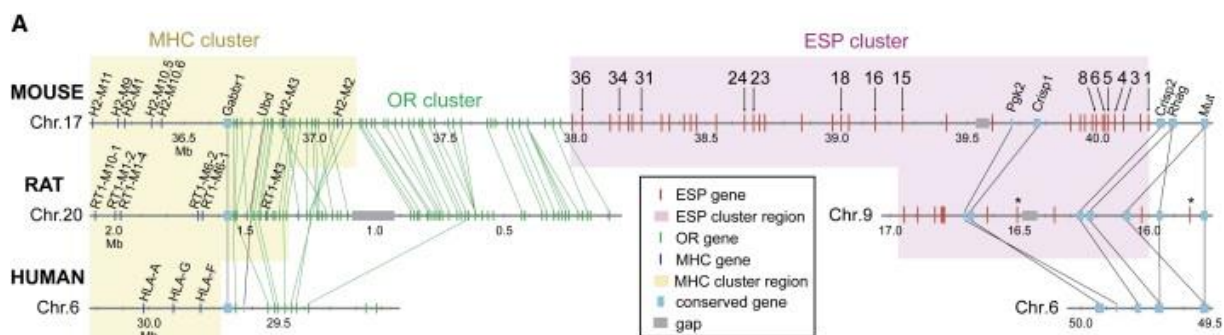


Figura 6: Posizione genomica della famiglia ESP nel topo e nel ratto ma assente nell'uomo. Il cluster ESP mostrato in rosa; il cluster MHC in giallo; il cluster OR in verde (Kimoto et al., 2007 *Curr. Biol.*;17:1879–84).

Dei 38 geni, 14 risultano pseudogeni e 24 vengono codificati per peptidi ESP intatti che risultano sesso e ceppo specifici (Kimoto et al., 2007). 15 dei 24 geni intatti vengono espressi nelle ghiandole extraorbitali, sottomascellari e harderiane di topi sessualmente maturi.

Per alcuni di questi peptidi ESP è stata riscontrata una specifica funzione feromonale. Tra gli ESP prodotti in età giovanile si riscontra ESP22 che viene secreto dalle ghiandole lacrimali e inibisce il comportamento sessuale dei topi adulti nei confronti dei piccoli (Ferrero et al 2013). Nello specifico ESP22 ricombinante spennellato sui topi adulti durante un'interazione sociale esercita un potente effetto inibitorio sul

comportamento sessuale del maschio adulto che viene abolito in topi knockout per il canale ionico TRPC2 (una componente chiave della segnalazione vomeronasale) (Leypold et al., 2002; Stowers et al., 2002). L'assenza del canale TRPC2 o la perdita di produzione dell'ESP22 provocano un aumento del comportamento sessuale dei maschi adulti nei confronti dei giovani.

Recentemente è stato identificato un altro feromone appartenente alla famiglia degli ESP denominato "exocrine secreting peptide 1" (ESP1). Tale feromone è un peptide non-volatile secreto esclusivamente dalle ghiandole extra e intraorbitali del maschio dopo la 4 settimana di vita (Kimoto et al., 2007; Haga et al., 2010; Cavaliere et al., 2014).

In particolare, ESP1 stimola le femmine ad assumere la caratteristica postura di lordosi (sollevamento della regione pelvica e con la schiena arcuata per favorire l'accoppiamento); mentre nel maschio coniugato con le urine promuove l'aggressività in presenza di un intruso durante un "intermale aggression test" (Haga et al., 2010; Cavaliere et al., 2014; Ishii et al., 2017). ESP1 si lega a livello di uno specifico recettore vomeronasale, il V2Rp5, un membro della famiglia di recettori V2R coinvolto nella modulazione del comportamento sessuale e aggressivo (Haga et al., 2010; Oboti et al., 2014; Ishii et al. 2017) . Gli assoni dei VSN innervano i glomeruli lungo l'asse rostro – caudale e soprattutto medio – laterale dell'AOB dove fanno sinapsi con cellule mitrali per la trasmissione dell'informazione a tre principali centri superiori: nucleo del letto della stria terminale (BNST), nucleo mediale dell'amigdala (MeA) e il nucleo posteriore corticale dell'amigdala (PMCO).

Studi recenti infatti, dimostrano che, in seguito a stimolazione con ESP1, indipendentemente dal sesso, si ha un aumento dell'espressione della proteina c – Fos nel BNST e MeA che innervano aree ipotalamiche inclusa l' area mediale preottica (MPA), e il nucleo ipotalamico ventromediale nella regione dorsomediale (VMHdm); mentre nel PMCO, l'espressione della proteina c-Fos è osservabile esclusivamente nelle femmine (Ishii et al., 2017) (Figura 7).

Sebbene nelle femmine il feromone ESP1 risulta sufficiente per la stimolazione del comportamento di lordosi, nel maschio invece la modulazione del comportamento aggressivo viene incrementato da un effetto sinergico tra peptide e urine maschili (Figura 7).

Questi dati dimostrano come le lacrime rappresentino una grande sorgente feromonale in grado di modulare i diversi comportamenti socio-sessuali.

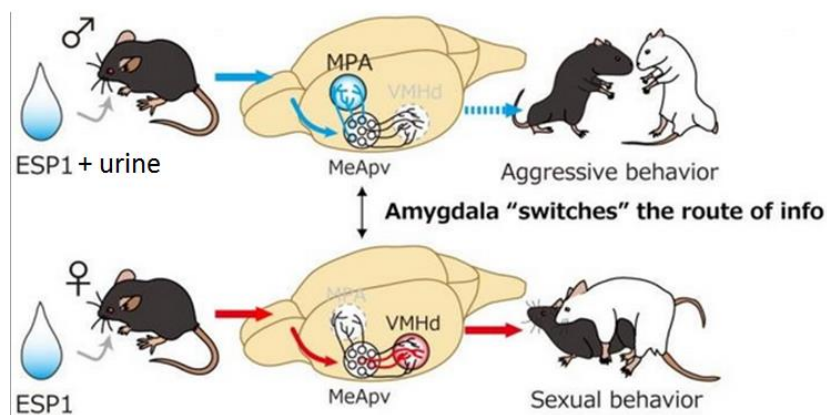


Figura 7: schema dei circuiti neurali preposti ai differenti comportamenti sociali.

Abbreviazioni: area mediale preottica (MPA), ipotalamo ventromediale parte dorso-mediale (VMHd), area postero-ventrale dell'amigdala mediale (MeApv)

L'attivazione dell'ipotalamo ventromediale stimola il comportamento aggressivo nel topo

Il comportamento aggressivo nei topi è un comportamento sociale innato e si basa sulla difesa del territorio e della prole verso intrusi conspecifici. Come accennato in precedenza l'aggressività viene stimolata da molecole odorose (presenti nelle urine e nelle lacrime) rilevate attraverso il sistema olfattivo (MOE e VNO). Infatti lesioni a carico del VNO o del MOE determinano alterazioni nel comportamento aggressivo del maschio e nell'aggressività materna (Mandiyan et al., 2005; Wang et al., 2006; Chamero et al., 2011; Stowers et al., 2002; Kimchi et al., 2007; Norlin et al., 2003; Leypold et al., 2002).

Un saggio comunemente utilizzato per testare l'aggressività maschile è rappresentato "dall'intermale-aggression test" (Connor et al., 1977; Maruniak et al., 1986). Tale test comportamentale si basa sul paradigma "resident-intruder" che prevede l'inserimento di un maschio intruso in una gabbia contenente un residente dello stesso sesso ospitato singolarmente. Dopo un periodo di indagini olfattive, per consentire il riconoscimento individuale, il residente inizia a manifestare una serie di comportamenti violenti verso l'intruso al fine di poterlo scacciare dal proprio territorio.

I circuiti olfattivi che innescano un comportamento aggressivo attivano i circuiti limbici dell'amigdala e dell'ipotalamo. Recentemente è stato identificato un sottonucleo del VMH, la parte ventrolaterale (VMHvl), per il suo ruolo cruciale nella stimolazione del comportamento aggressivo nei topi maschi; il silenziamento di questa area sopprime il comportamento di attacco mentre la sua stimolazione promuove comportamenti aggressivi nei maschi anche a contatto con femmine o oggetti inanimati (Lee et al., 2014; Lin et al., 2011, Yang et al. 2013).

I neuroni VMHvl risultano estremamente ricchi di recettori ormonali, compreso il recettore alfa per gli estrogeni (Ers1), e il recettore del progesterone (PR). L'attivazione di tali recettori risulta importante per la stimolazione del comportamento aggressivo (Yang et al., 2013, 2017; Lee et al., 2014; Hashikawa et al., 2017). Il

silenziamento delle cellule PR+ o Ers1+, determina un'inibizione del comportamento aggressivo nei topi (Yang et al., 2013; Lee et al., 2014; Hashikawa et al., 2017). Viceversa, l'attivazione delle cellule Esr1+ provoca una riduzione nella latenza di attacco mentre l'attivazione farmacologica delle cellule PR+ aumenta la frequenza degli attacchi durante un "intermale aggression test" (Lee et al., 2014; Hashikawa et al., 2017; Yang et al., 2017). Inoltre la stimolazione del comportamento aggressivo è stata osservata in seguito ad attivazione delle cellule PR+ in maschi castrati o con deficit del sistema olfattivo, suggerendo che il VMHvl risulta estremamente importante nella modulazione dell'aggressività nel topo (Yang et al., 2017).

Oltre alla presenza di recettori ormonali che stimolano il comportamento aggressivo, recenti studi hanno evidenziato un'elevata risposta da parte del VMHvl in seguito a specifici stimoli olfattivi che promuovono l'aggressività (Falkner et al., 2014).

Durante un "intermale aggression test", i maschi residenti presentano un aumento di cellule neuronali attive nel VMHvl dopo aver annusato le urine o le lacrime del maschio intruso (Lin et al., 2011; Falkner et al., 2014; Hattori et al., 2016).

3.SCOPO DELLA TESI

Nei mammiferi, molti comportamenti sociali sono modulati da stimoli feromonalmente che agiscono attraverso il sistema olfattivo. Nei topi i feromoni sono contenuti in molti fluidi corporei come l'urina, le feci, la saliva, il fluido lacrimale e vaginale.

Dati presenti in letteratura mostrano che il fluido lacrimale del topo rappresenta una grande sorgente feromonale in grado di modulare differenti comportamenti sociali tra conspecifici.

Sebbene nelle lacrime del maschio siano stati identificati e purificati molti feromoni che stimolano comportamenti aggressivi e sessuali, tuttavia il ruolo del fluido lacrimale delle femmine nella modulazione di tali comportamenti risulta tuttora sconosciuto.

Di conseguenza nella prima fase del mio lavoro di tesi ho valutato la valenza del fluido lacrimale delle femmine nella modulazione del comportamento aggressivo nel topo. Mentre nella seconda parte del mio progetto di dottorato ho indagato sui centri che regolano l'aggressività nel topo maschio in seguito ad uno stimolo lacrimale.

4.MATERIALI E METODI

Animali

Gli animali utilizzati in questo lavoro di dottorato, sono stati acquistati dall' Harlan e allevati nello stabulario del Dipartimento di Medicina e Chirurgia dell'Università degli studi di Parma. Gli animali sono stati stabulati in condizioni di 12h di luce e 12h di buio e una temperatura di 25°C. Tutti gli esperimenti comportamentali sono stati condotti in una stanza dello stabulario al fine di ridurre al minimo i fattori di variabilità ed effettuati nell'assoluto rispetto della Direttiva Europea (Direttiva 2010/63/UE) e Italiana vigenti (D.Lgs. n. 26 del 14 marzo 2014). Le tecniche utilizzate sono state approvate ai sensi dell'art. 31 del D.Lgs n.26/2014 dal Ministero della Salute e dall'OPBA (Organizzazione Preposta al Benessere Animale). ID autorizzazione : 863/2017-PR.

Operazioni chirurgiche

Ovariectomia bilaterale

L'ovariectomia bilaterale è stata effettuata in femmine di ceppo Balb/c di 3 settimane di età.

Gli animali sono stati prima anestetizzati con una soluzione (0.1ml/10g corporei) di xylazina (1mg/ml) e ketamina (10mg/ml).

I topi sono stati posti ventralmente in modo da disinfettare e rasare l'area chirurgica dorsale.

Al fine di creare un accesso nell'area dorsale, è stata effettuata una singola incisione sulla linea mediana dorsale e caudalmente all'ultima costola della gabbia toracica. Utilizzando piccole forbici sterili, viene eseguita una piccola incisione dorsale di 0.5cm lungo l'asse delle vertebre lombari. Successivamente la pelle ai lati del taglio è stata separata dal muscolo sottostante con l'utilizzo delle pinze chirurgiche. La stessa incisione è stata usata al fine di rimuovere entrambe le ovaie. Esternalizzati gli ovidotti con le ovaie, una legatura sterile è stata posta intorno a ciascun ovidotto con successiva

rimozione delle ovaie. Il piano chirurgico è stato suturato applicando due punti staccati (Sophocleousa et al., 2014). L'animale è stato sottoposto ad un recupero post-operatorio per circa 3 settimane prima di procedere al prelievo del fluido lacrimale.

Castrazione di maschi CD1

La castrazione è stata eseguita su topi maschi di ceppo CD1 di 2 settimane di età.

Gli animali sono stati anestetizzati con una soluzione (0.1ml/10g corporei) di xylazina (1mg/ml) e ketamina (10mg/ml).

I topi anestetizzati sono stati posizionati dorsalmente in modo da poter disinfettare lo scroto. Utilizzando piccole forbici sterili, è stata effettuata un'incisione cutanea sul lato ventrale dello scroto (0.5cm). I testicoli vengono esternalizzati e posta una legatura subito al di sotto per permettere la loro rimozione. Il piano chirurgico è stato suturato con due punti staccati. L'animale è stato sottoposto ad un recupero post-operatorio per circa 3 settimane.

Asportazione delle ghiandole lacrimali extraorbitali

L'asportazione delle ghiandole lacrimali extraorbitali è stata eseguita su femmine di ceppo Balb/c di 4 settimane di età.

I topi sono stati anestetizzati con una soluzione (0.1ml/10g corporei) di xylazina (1mg/ml) e ketamina (10mg/ml).

La ghiandola lacrimale extraorbitale è posta superficialmente tra l'arcata mascellare laterale e la rima oculare di *Mus musculus* (nel mio caso di ceppo Balb/c). La sua rimozione prevede un taglio della cute di circa 5mm nella posizione sopradescritta e la ghiandola, collocandosi subito al di sotto del sito di taglio, viene asportata rapidamente con successiva sutura cutanea mediante 2 punti staccati (Cavaliere et al., 2014). L'animale è stato sottoposto ad un recupero post-operatorio mediante antibiotici locali

(Tobral pomata antibiotica oftalmica) per circa 3 settimane prima di procedere al prelievo del fluido lacrimale (Cavaliere et al., 2014).

Prelievo del fluido lacrimale

La procedura consiste nel pipettare 10 µl di acqua MilliQ per ciascun occhio, due volte al giorno (primo prelievo ore 12:00 ; secondo prelievo della giornata ore 17:00) dopo aver ripulito la zona sub-oculare con cotone imbevuto di acqua borica.

Tutti i campioni di fluido lacrimale hanno subito un processo di liofilizzazione e riconcentrati 10 volte (in acqua MilliQ) rispetto al loro volume di partenza. I campioni così ottenuti sono stati conservati in freezer a -20°C.

Identificazione delle fasi del ciclo estrale della femmina

Per poter prelevare il fluido lacrimale in fase di estro o di diestro del ciclo estrale della femmina, ho effettuato una prima analisi visiva dell'orifizio vaginale, in quanto poco invasiva e non richiede attrezzature speciali. Per identificare le fasi ho preso in considerazione i seguenti parametri: in fase di diestro l'orifizio vaginale si presenta con una piccola apertura, i tessuti risultano di colore blu-viola e molto umida (Figura 1). In fase di estro invece, si osserva un'elevata apertura dell'orifizio, i tessuti risultano più rosei e meno umidi con striature più pronunciate.

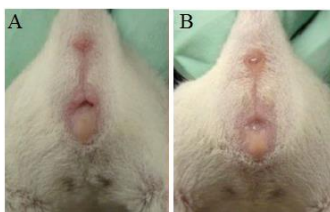


Figura 1: (A – B) Visualizzazione delle fasi estrali in un ceppo albino Balb/c; estro (A), diestro (B).

Selezionate le femmine in estro e diestro ho confermato il dato mediante l'analisi citologica (McLean et al., 2012). Ho prelevato le cellule vaginali pipettando 30 µl a livello dell'orifizio vaginale con acqua distillata. Una volta prelevato il fluido vaginale è stato riversato su un vetrino e lasciato asciugare a temperatura ambiente. In ultima fase le cellule vaginali sono state colorate mediante l'utilizzo del crystal violetto. Il rapporto tra i tipi cellulari presenti nello striscio è stato utilizzato per identificare la fase estrale del topo nel giorno di raccolta del campione. Nello specifico in fase di estro prevalgono cellule epiteliali cornificate squamose presenti in cluster; mentre in fase di diestro prevalgono cellule leucocitarie.

Dialisi

Il fluido lacrimale (2ml) di femmine di ceppo Balb/c (n=10) è stato dializzato contro 4 ml di acqua distillata per 24 hr a 4°C utilizzando membrane Spectrapore con taglio molecolare di 2KDa. Le frazioni dializzate e non dializzate sono state quindi raccolte, liofilizzate e risospese nel volume originario (2ml).

Test comportamentali

“Intermale-aggression test”

Per verificare il ruolo del fluido lacrimale delle femmine nella modulazione del comportamento aggressivo, topi maschi CD1 di 8-12 settimane di età sono stati isolati una settimana prima “dell’intermale aggression test” (Connor et al.,1977; Maruniak et al.,1986).

Nella gabbia del residente è stato inserito un intruso spennellato (150µl) sulla regione dorsale facciale e ano-genitale con i fluidi lacrimali di differenti ceppi di femmine. Come controllo i maschi residenti sono stati esposti ad intrusi tamponati con i fluidi lacrimali del maschio o acqua.

L’aggressività verso l’intruso è stata quantificata mediante l’osservazione di quattro parametri essenziali:

1. il tempo di latenza (lag time) che intercorre tra l’inserimento dell’intruso e il primo morso da parte del residente;
2. il numero di morsi inflitti dal residente all’intruso;
3. il numero degli attacchi inflitti dal residente all’intruso;
4. la durata degli attacchi (morsi e inseguimenti) condotti verso l’intruso da parte del residente.

“L’intermale-aggression test” è stato eseguito per un tempo di 10 min e in una gabbia di 22x16x14 cm.

I test sono stati condotti senza nessuna fonte esterna di disturbo in una stanza dello stabulario.

A tale scopo è stato utilizzato un sistema di videosorveglianza e le registrazioni sono state visualizzate a velocità ridotta mediante software di analisi etologica “The Observer”, che consente di registrare la frequenza e la durata dei comportamenti in esame.

“Intermale aggression test” utilizzando maschi castrati come intrusi

Per valutare il ruolo del fluido lacrimale del maschio nella modulazione del comportamento aggressivo, “l’intermale aggression test” è stato eseguito utilizzando maschi castrati in età prepuberale. Come descritto nell’introduzione la castrazione riduce i livelli di aggressività in maschi conspecifici. In questo modo spennellando il fluido lacrimale sulla regione facciale dorsale e ano genitale di un maschio castrato prima di un “intermale aggression test”, ci permette di osservare i possibili effetti mediati dal fluido lacrimale del maschio sul comportamento aggressivo.

I topi maschi CD1 di 8-12 settimane di vita sono stati isolati una settimana prima del test.

Il test è stato eseguito per un periodo di 5 giorni ed è stato suddiviso in tre fasi. In particolare, il primo giorno, ogni topo residente è stato confrontato con un maschio intruso intatto per valutare i parametri di aggressività (latenza, durata e numero degli attacchi e la frequenza dei morsi). Nei successivi tre giorni gli stessi maschi residenti sono stati esposti a maschi castrati per valutare quantitativamente la perdita di aggressività. Infine, il quinto giorno, gli stessi maschi castrati sono stati spennellati con il fluido lacrimale del maschio Balb/c prima di eseguire “l’intermale-aggression test”.

Ogni trial sperimentale presenta una durata di 10 minuti in gabbia di plexiglass 22x16x14.

Immunofluorescenza

Gli animali, 90 min dopo “l’intermale aggression test”, sono stati anestetizzati con una miscela di xylazina/ketamina e perfusi con tampone fosfato salino (PBS1X) e successivamente con paraformaldeide al 4% (PFA 4%) e saccarosio al 30%. Il cervello è stato asportato e crioprotetto per una notte in saccarosio 30%. I tessuti sono stati congelati in pentano prima di subire il taglio al criostato.

Sezioni coronali, dello spessore di 40 μm sono state poste su vetrini gelatinizzati e trattate con triton 0.3% per 3 minuti. Sono state quindi incubate con l'anticorpo primario C-Fos (Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:100 nella soluzione di blocco costituita da albumina sierica bovina 1% triton X-100 0,3%, per 48 ore a 4°C.

Successivamente le sezioni sono state lavate con PBS ed incubate in anticorpo secondario fluorescente anti-goat (Invitrogen) per 3h. Infine sono state coperte con il vetrino copri oggetto, osservate al microscopio e fotografate

Conta cellulare

In ogni soggetto, le aree neuroanatomiche nel cervello di maschio CD1 sono state determinate attraverso l’atlante del cervello del topo (Paxinos and Franklin 2001).

Le aree limbiche prese in esame sono: nucleo dell’amigdala mediale (MeA), nucleo ipotalamico ventromediale parte ventrolaterale (VMHvl), nucleo ipotalamico dorsomediale (DMH) e l’abenula laterale (LHb).

Di ciascun nucleo sono state prese in considerazione 4 sezioni seriali marcate per la proteina neuronale c-Fos. Le sezioni sono state fotografate utilizzando una fotocamera digitale Nikon. Le immagini fluorescenti sono state analizzate utilizzando il software Nis Elements (Nikon) per valutare la superficie delle aree. La media delle cellule c-Fos positive presenti in ciascun nucleo è stata utilizzata per l’analisi statistica.

Analisi statistica dei dati

L'analisi statistica è stata effettuata mediante l'utilizzo del software SPSS.

Ogni parametro comportamentale "dell'intermale aggression test" nei maschi CD1 è stato analizzato utilizzando le medie per campioni indipendenti nel t-test di Student.

I parametri comportamentali "dell'intermale aggression test" che prevede l'utilizzo dei castrati sono stati analizzati mediante analisi della varianza a misure ripetute (ANOVA) in cui il fattore ripetuto era il residente che veniva continuamente esposto a differenti intrusi o stimoli lacrimali.

Il numero di neuroni c-fos positivi è stato analizzato mediante ANOVA a due vie in ogni area del cervello analizzata.

5.RISULTATI

Il fluido lacrimale come inibitore del comportamento aggressivo nei maschi

Nei miei esperimenti ho valutato il ruolo del fluido lacrimale delle femmine, nella modulazione del comportamento aggressivo dei maschi. A tale scopo, maschi intrusi di ceppo CD1 sono stati spennellati sulla regione dorsale, facciale e ano-genitale, con i fluidi lacrimali di differenti ceppi di femmina (Balb/c, C57Bl/6 e CD1) prima di “un intermale-aggression test”.

L’analisi dei dati ha evidenziato una sorprendente riduzione del comportamento aggressivo, che normalmente viene esibito tra due maschi adulti. Quando ho inserito un maschio intruso, tamponato con le lacrime di femmina Balb/c, nella gabbia del maschio residente, il numero e la durata degli attacchi e la frequenza dei morsi risultavano ridotti rispetto ai controlli in cui l’intruso è spennellato con acqua ($F = 11.003$, $\sigma = 0.003$, $p < 0.001$; $F = 3.977$, $\sigma = 0.056$, $p < 0.001$; $F = 0.115$, $\sigma = 0.737$, $p < 0.001$ rispettivamente).

Questi risultati suggeriscono che nel fluido lacrimale delle femmine, vi siano delle molecole in grado di inibire l’aggressività tra maschi conspecifici (Figura 1). Sebbene le lacrime dei differenti ceppi risultano tutte attive nell’inibire l’aggressività, tuttavia i risultati evidenziano un effetto maggiore utilizzando le lacrime del ceppo Balb/c.

Dal momento che, è stato riportato che le urine di femmina presentano un effetto inibitorio sul comportamento aggressivo durante “un intermale aggression test” (Mugford et al., 1970; Dixon et al., 1971; Haag et al., 1973), ho effettuato una serie di esperimenti al fine di escludere una contaminazione urinaria nella regione del pelo sub-oculare durante il prelievo del fluido lacrimale e poter attribuire alle lacrime l’effetto osservato.

A tale scopo, femmine di ceppo Balb/c sono state operate chirurgicamente mediante asportazione delle ghiandole extraorbitali (LGX), responsabili della produzione dei principali prodotti lacrimali.

Il fluido prelevato da questi animali, mostra una riduzione dell'effetto inibitorio con un aumento del comportamento aggressivo rispetto a quello osservato con il fluido lacrimale delle femmine intatte. Il numero e la durata degli attacchi e la frequenza dei morsi del residente a contatto con il fluido delle femmine LGX erano superiori a quelle effettuate dal maschio a contatto con le lacrime provenienti da femmine intatte ($F = 0.191$, $\sigma = 0.666$, $p < 0.001$; $F = 0.231$, $\sigma = 0.635$, $p < 0.001$; $F = 0.177$, $\sigma = 0.677$, $p = 0.001$, rispettivamente) (Figura 1).

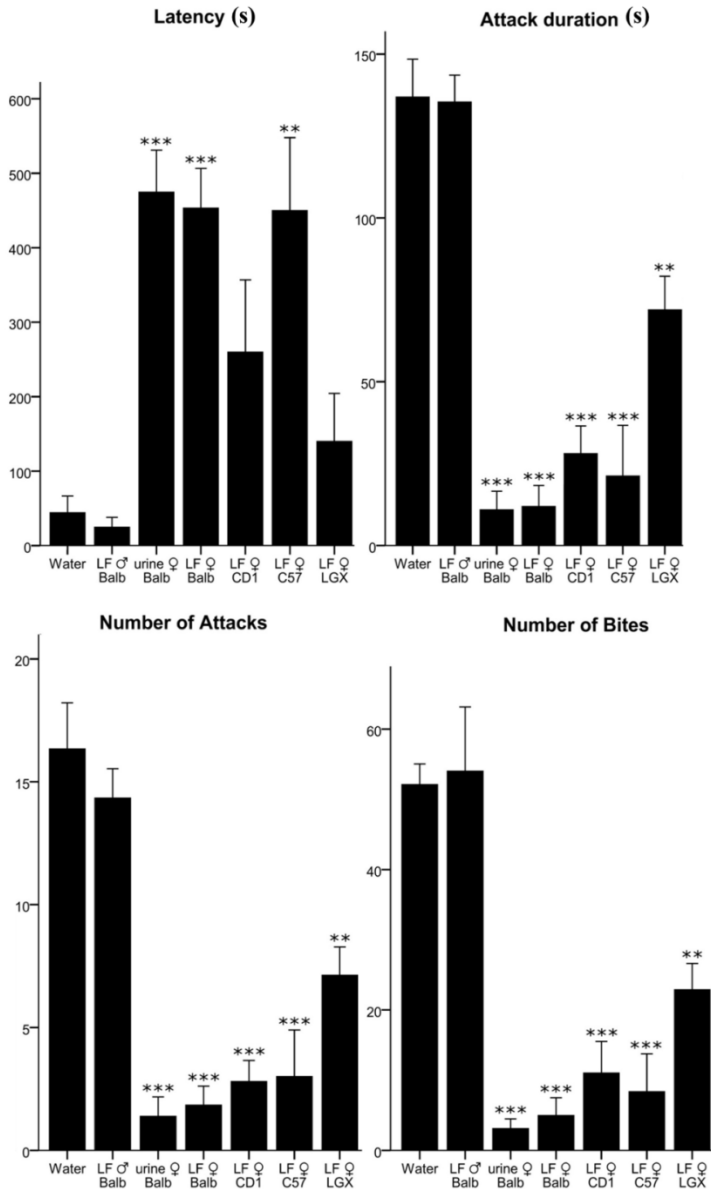


Figura 1: Il fluido lacrimale delle femmine inibisce il comportamento aggressivo dei maschi nel topo. Maschi residenti CD1 (n=7) sono stati confrontati con topi intrusi CD1 spennellati con acqua, urine e fluidi lacrimali (LF) di differenti ceppi. L'analisi dei parametri relativi al comportamento aggressivo del maschio residente ha mostrato che le urine e i fluidi lacrimali delle femmine inibiscono l'aggressività. I fluidi lacrimali ottenuti da femmine private delle ghiandole extraorbitali (LF LGX) presentano una riduzione dell'effetto inibitorio dell'aggressività (media \pm s.e.m.; n=7; $** \leq 0.01$, $*** \leq 0.001$ ANOVA).

Il fluido lacrimale prelevato in assenza delle ghiandole extraorbitali influenza fortemente l'effetto inibitorio del comportamento aggressivo, tuttavia, il fluido LF-LGX era in grado di ridurre i livelli di aggressività tra maschi se confrontati con il gruppo di controllo (residenti scontrati con maschi intrusi tamponati con acqua). Per escludere ulteriormente una possibile contaminazione urinaria durante la raccolta delle lacrime ho misurato i livelli di creatinina sia nelle urine che nelle lacrime, visto che la creatinina viene escreta attraverso le urine. I miei risultati evidenziano che la concentrazione di creatinina nelle lacrime di femmina era almeno 5000 volte inferiore rispetto a quelle osservate nelle urine e la metà di quella contenuta nel plasma e nella saliva. Sebbene la presenza di creatinina nelle lacrime, anche a bassissime concentrazioni porterebbe ad ipotizzare una contaminazione urinaria, tuttavia quando ho testato le urine diluite 1000 volte durante "un intermale aggression test", l'effetto inibitorio risultava abolito (Figura 2).

Ci siamo chiesti se le molecole lacrimali che stimolano l'inibizione del comportamento aggressivo potessero modulare altri comportamenti durante le interazioni sociali. Sorprendentemente, in tutti gli esperimenti, la riduzione dell'aggressività è stata spesso correlata ad un aumento del comportamento sessuale e di investigazione, una condizione generalmente osservata durante l'interazione maschio-femmina. Come si può osservare dalla Figura 3, la maggior parte dei maschi a contatto con le lacrime delle femmine presentano un aumento significativo delle monte che risulta completamente assente nei topi spennellati con acqua ($F = 4.648$, $\sigma = 0.068$, $p = 0.044$) o con fluido lacrimale del maschio (dati non mostrati).

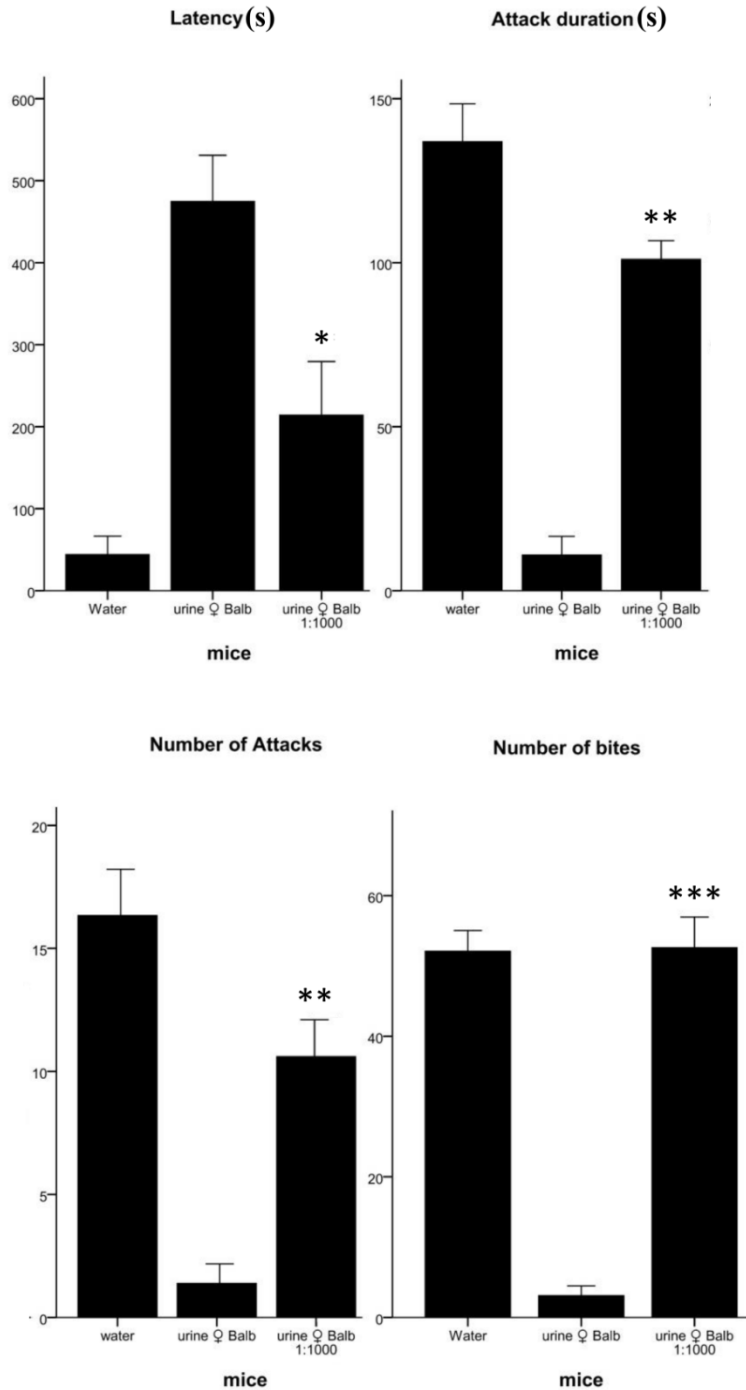


Figura 2: l'urina diluita non altera i normali comportamenti sociali tra due maschi conspecifici. Maschi CD1 (n = 5) sono stati scontrati con maschi tamponati con acqua, urina prelevata da femmine intatte e urina diluita (1:1000). (Media \pm s.e.m. ; n = 7; * \leq 0.05, ** \leq 0.01, ANOVA).

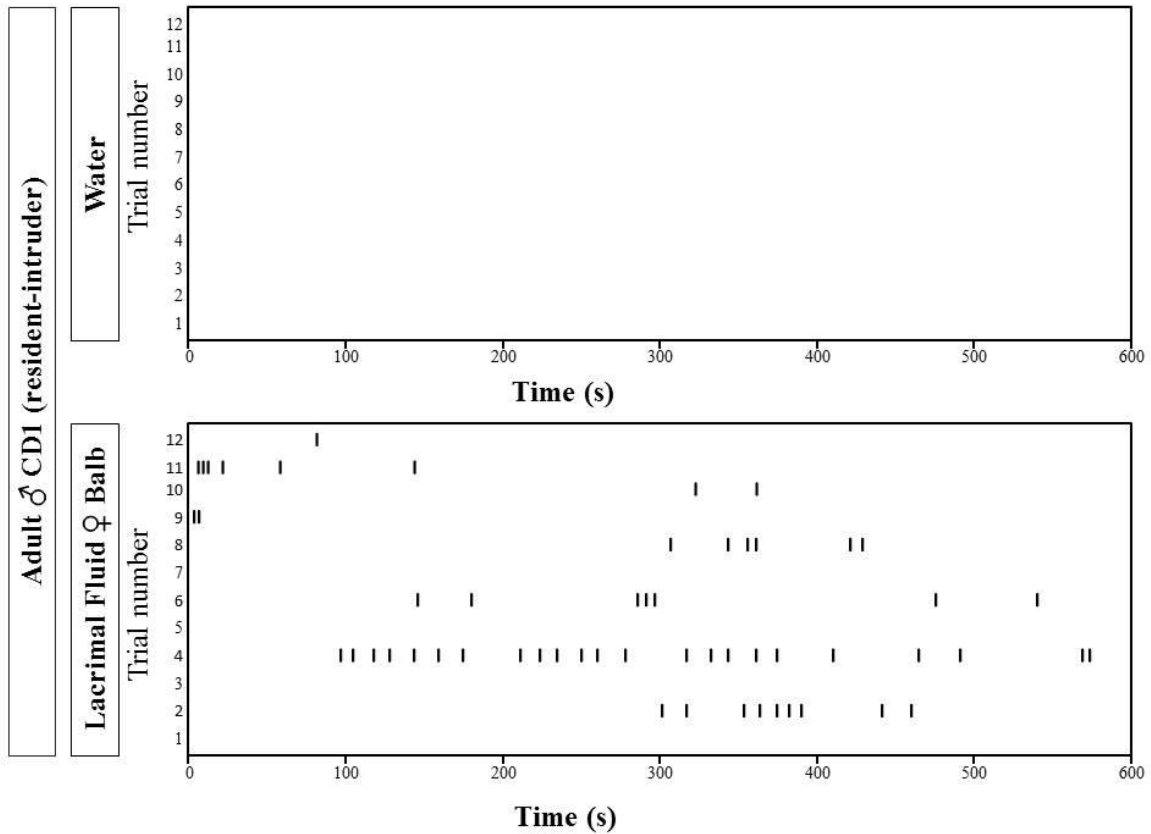


Figure 3: Il fluido lacrimale delle femmine stimola il comportamento sessuale nei maschi residenti. “Raster Plot” : rappresentazione schematica delle monte effettuate da ogni residente nei confronti di un intruso.

Le ovaie modulano la produzione di molecole inibitrici dell'aggressività

È noto che il comportamento sessuale maschile è stimolato da ferormoni femminili prodotti principalmente a livello delle ovaie (Kim et al., 2016). Poiché il comportamento di monta del maschio aumenta fortemente in presenza di una femmina in fase di estro (Kim et al., 2016; Ingersoll 1987), ci siamo chiesti se la fase di estro abbia un ruolo rilevante nella produzione di queste molecole lacrimali.

A tale scopo ho prelevato il fluido lacrimale dalle femmine in fase di estro (stato in cui la femmina risulta recettiva per la copulazione) e di diestro (fase in cui la femmina non favorisce l'accoppiamento). Sorprendentemente i miei risultati mostrano che l'effetto inibitorio non è influenzato dalle fasi estrali, infatti non si evidenziano differenze significative in termini di latenza, frequenza dei morsi, durata e numero di attacchi ($F = 0.057$, $\sigma = 0.821$, $p = 0.752$; $F = 3.624$, $\sigma = 0.115$, $p = 0.332$; $F = 5.214$, $\sigma = 0.071$, $p = 0.376$; $F = 3.580$, $\sigma = 0.117$, $p = 0.448$) (Figura 4).

Anche se le molecole inibenti l'aggressività non sono correlate al ciclo estrale delle femmine questo non esclude un possibile coinvolgimento delle ovaie nella loro produzione. È noto che le ovaie rappresentano una grande sorgente ormonale in grado di stimolare la sintesi di molecole in organi bersaglio. Di conseguenza, per verificare l'influenza delle ovaie nella produzione delle molecole inibenti l'aggressività, femmine di ceppo Balb/c sono state prima ovariectomizzate (OVX) e dopo un periodo di recupero ho prelevato il fluido lacrimale per testare la sua capacità nella modulazione dei comportamenti sociali tra maschi. Le analisi quantitative rilevano che le lacrime delle femmine ovariectomizzate influenzano fortemente l'aggressività maschile. Il numero e la durata degli attacchi, come anche il numero dei morsi risultano ridotti rispetto ai controlli (intrusi tamponati con acqua) ($F = 1.784$, $\sigma = 0.202$, $p = 0.021$; $F = 0.014$, $\sigma = 0.908$, $p = 0.003$, $F = 0.008$, $\sigma = 0.930$, $p < 0.001$ rispettivamente). Tuttavia, l'assenza di ovaie ha influito sull'effetto di inibizione del comportamento aggressivo. Inaspettatamente i maschi residenti scontrati con gli intrusi spennellati con le lacrime di femmine OVX, rispetto agli intrusi tamponati con il fluido lacrimale delle femmine

intatte, presentano un aumento dei livelli di aggressività (latenza $F = 0.960$, $\sigma = 0.338$, $p = 0.037$; durata degli attacchi $f = 2.930$, $\sigma = 0.102$, $p = 0.035$; numero degli attacchi $F = 1.057$, $\sigma = 0.316$, $p = 0.003$; numero dei morsi $F = 0.098$, $\sigma = 0.757$, $p = 0.060$) (Figura 4). Questo suggerisce che le ovaie influiscono solo parzialmente sulla produzione di queste molecole.

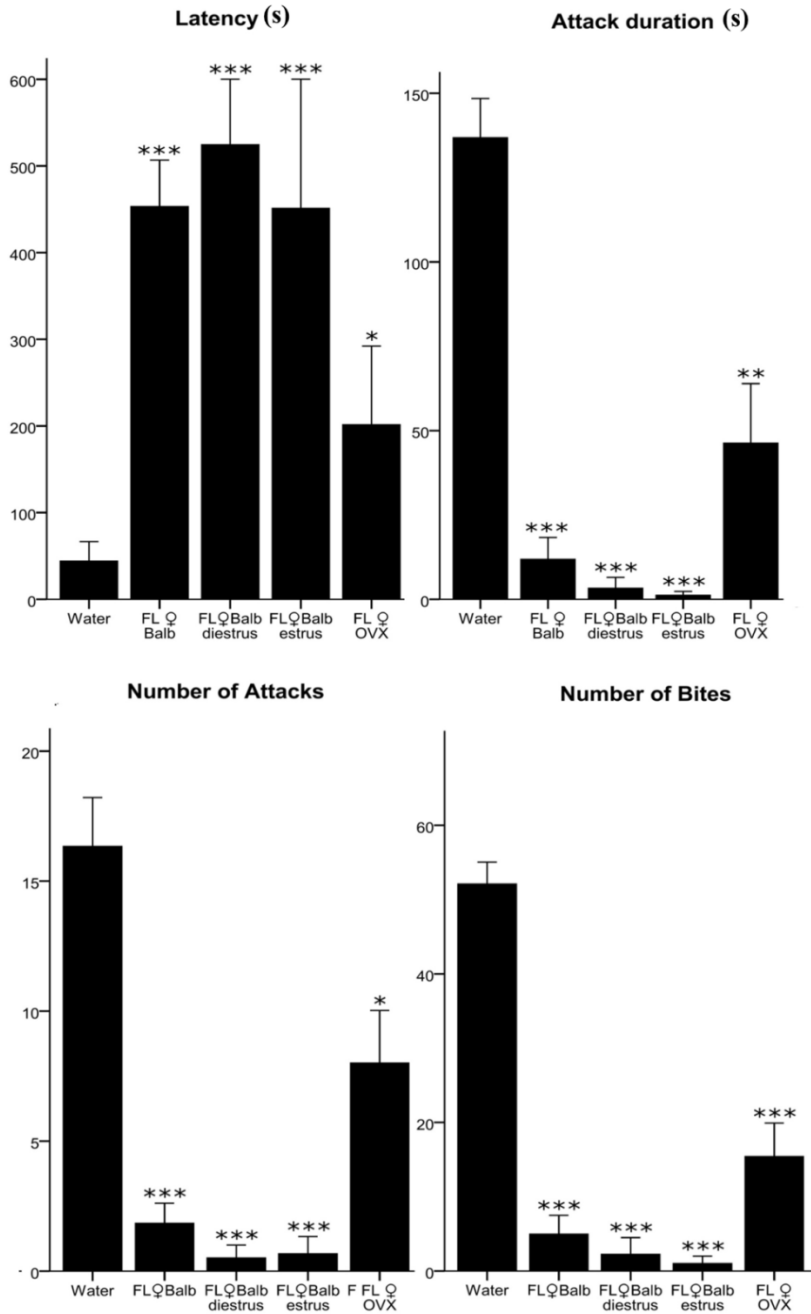


Figura 4: I cicli estrali e l'ovariectomia contribuiscono in modo diverso nella produzione di sostanze inibenti l'aggressività. Maschi CD1 (n = 5) sono stati scontrati con intrusi spennellati con i fluidi lacrimali di femmine ovariectomizzate (LF ovx), femmine intatte in fase di estro (LF estrus) e diestro (LF diestrus) (average \pm s.e.m.; n=7; ** \leq 0.01, *** \leq 0.001 t-test).

Il fluido lacrimale del maschio non incrementa il comportamento aggressivo

È noto che il fluido lacrimale del maschio rappresenta una grande sorgente di molecole in grado di stimolare i diversi comportamenti socio sessuali (Touhara et al., 2007; Kimoto et al., 2005). Tra queste molecole prodotte esclusivamente nel maschio è stato identificato un peptide denominato “exocrine glands secreting peptides 1” (ESP1), in grado di trasmettere le informazioni feromonali a entrambi i sessi nel topo (Touhara, 2007; Kimoto et al., 2005; Kimoto et al., 2007). Ad esempio, topi femmina esposti ad ESP1 purificato induce un aumento del comportamento sessuale, stimolando la caratteristica postura di lordosi (sollevamento della regione pelvica e con la schiena arcuata per favorire l'accoppiamento) (Haga et al., 2010); mentre nel maschio, incrementa il comportamento aggressivo se coniugato con le urine durante un “intermale aggression test” (Ishii et al., 2017). I risultati mostrati in Figura 1 sembrano escludere che il fluido lacrimale del maschio, che indubbiamente contiene ESP1, eserciti un effetto modulatore sull'aggressività maschile, poiché il numero e la durata degli attacchi inflitti dal residente ad un intruso spennellato con fluido lacrimale maschile sono quantitativamente simili ai controlli (intruso tamponato con acqua) ($F = 5.109$, $\sigma = 0.042$, $p = 0.389$; $F = 3.163$, $\sigma = 0.099$, $p = 0.951$). D'altra parte, i miei topi CD1 presentano livelli di aggressività basale, molto alti rispetto agli altri ceppi, rendendo difficile rilevare potenziali incrementi delle prestazioni di questo comportamento. Per aggirare questo problema, i topi maschi CD1 sono stati castrati e utilizzati come intrusi in un “intermale aggression test” modificato. Come descritto nell'introduzione la castrazione riduce i livelli di aggressività in maschi conspecifici. In questo modo spennellando il fluido lacrimale sulla regione facciale dorsale e ano genitale di un maschio castrato prima di un “intermale aggression test”, ci permette di osservare i possibili effetti mediati dal fluido lacrimale del maschio sul comportamento aggressivo. Il test è stato eseguito per un periodo di 5 giorni ed è stato suddiviso in tre fasi. In particolare, al primo giorno, ogni topo residente è stato confrontato con un maschio intruso intatto per valutare i parametri di aggressività (latenza, durata e

numero degli attacchi e la frequenza dei morsi). Nei successivi tre giorni gli stessi maschi residenti sono stati esposti con maschi castrati per valutare quantitativamente la perdita di aggressività. Infine, il 5 giorno, gli stessi maschi castrati sono stati spennellati con il fluido lacrimale del maschio Balb/c prima di eseguire “l’intermale-aggression test”. Come previsto, l’aggressività è stata fortemente ridotta quando i maschi castrati sono stati utilizzati come intrusi; tuttavia, il fluido lacrimale del maschio spennellato su un intruso castrato, non era in grado di incrementare il comportamento aggressivo nei residenti durante “un intermale aggression test” (durata dell’attacco, $F = 13.771$, $p = 0.49$, numero di attacchi $F = 1.003$, $p = 0.85$, numero di morsi $F = 4.47$, $p = 0,64$) (Figura 5). Questi dati confermano che le lacrime maschili non svolgono un ruolo significativo sulla modulazione del comportamento aggressivo.

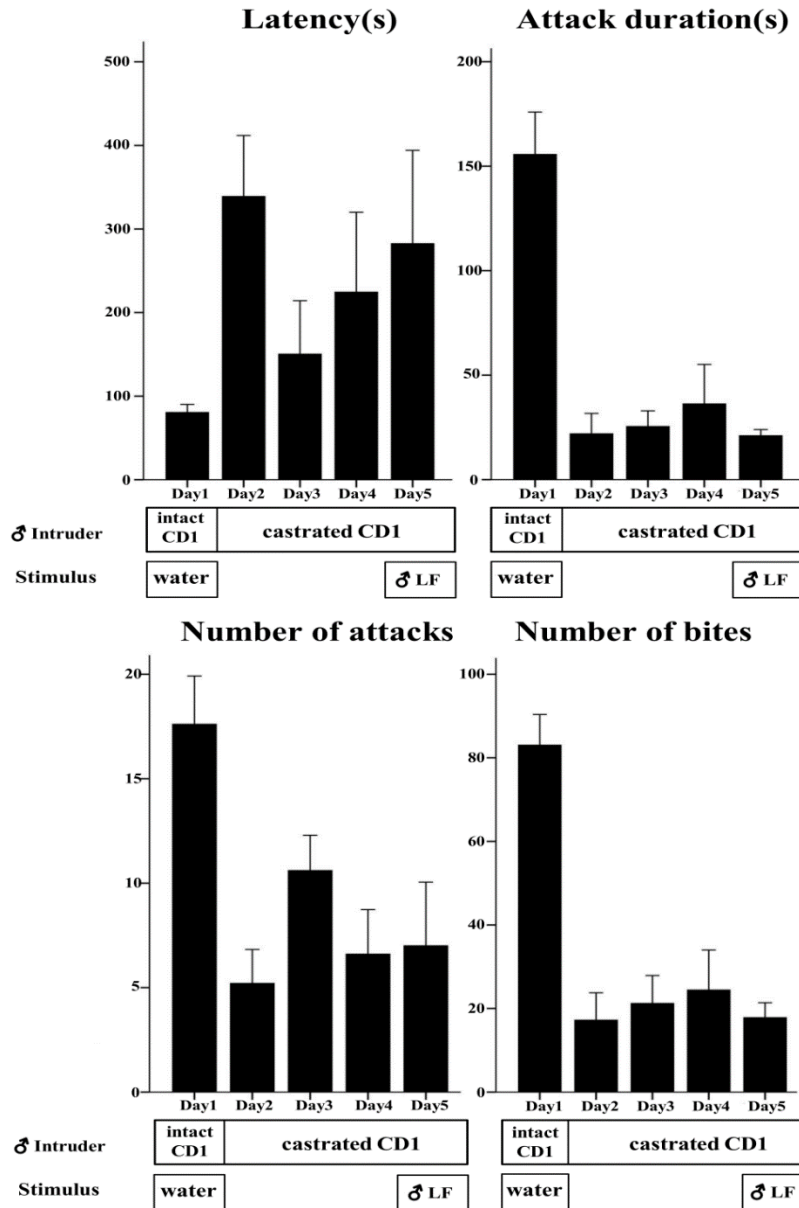


Figura 5: Il fluido lacrimale del maschio Balb/c non contiene promotori del comportamento aggressivo. Maschi CD1 residenti (n = 5) sono stati ripetutamente scontrati con i seguenti gruppi di topi intrusi: topi intatti CD1 (giorno 1), castrati CD1 (giorni 2-4), castrati spennellati con fluido lacrimale di maschi Balb/c (castrated-LF) (giorno 5). I fluidi lacrimali dei maschi Balb/c non stimolano un aumento significativo dei diversi parametri relativi all'aggressività dei maschi residenti. (Analisi della varianza con misure ripetute ANOVA).

Caratterizzazione preliminare delle possibili dimensioni delle molecole inibenti

L'aggressività

Dopo aver dimostrato che le lacrime delle femmine sono in grado di inibire il comportamento aggressivo, ho effettuato una prima caratterizzazione al fine di poter ottenere delle informazioni sulla natura chimica delle molecole. Le mie osservazioni preliminari suggeriscono che tali molecole non sono fortemente volatili dal momento che tutti i fluidi lacrimali, prima di esser testati hanno subito un lungo processo di liofilizzazione che mi ha permesso di rimuovere dal campione le molecole con basso punto di ebollizione (Antal et al 2011; Aggio et al.,2016). Per ottenere delle prime informazioni grossolane sulle dimensioni delle molecole inibenti, 2 ml di liquido lacrimale femminile sono stati sottoposti a dialisi contro 4 ml di acqua utilizzando una membrana di cutoff di 2KDa per 24 ore. Le frazioni dializzate (OUT) e non dializzate (IN) sono state quindi raccolte, liofilizzate e risospese al volume originale (2 ml). I miei risultati mostrano che in “un intermale aggression test”, il fluido lacrimale dializzato (OUT) inibisce fortemente l'aggressività del maschio residente con un effetto quantitativamente simile a quello osservato con il fluido lacrimale delle femmine intatte (latenza $F = 2.40$, $\sigma = 0,13$, $p = 0,68$, durata dell'attacco $F = 0,18$, $\sigma = 0,67$, $p = 0,82$, numero di attacchi $F = 1,03$, $\sigma = 0,32$, $p = 0,94$, numero dei morsi $F = 0,37$, $\sigma = 0,55$, $p = 0,87$). Al contrario, la frazione non dializzata ha mostrato solo una modesta riduzione ma ancora significativa dei livelli di aggressività se confrontata con il fluido delle femmine intatte (Latenza $F = 0,02$, $\sigma = 0,89$, $p = 0,06$, durata dell'attacco $F = 0,10$, $\sigma = 0,65$, $p = 0,02$; degli attacchi $F = 1,82$, $\sigma = 0,19$, $p = 0,018$, numero di morsi $F = 0,19$, $\sigma = 0,67$, $p = 0,02$). (Figura 6).

Questi risultati indicano che queste sostanze inibitrici presentano un peso molecolare relativamente basso e risultano parzialmente dializzabili.

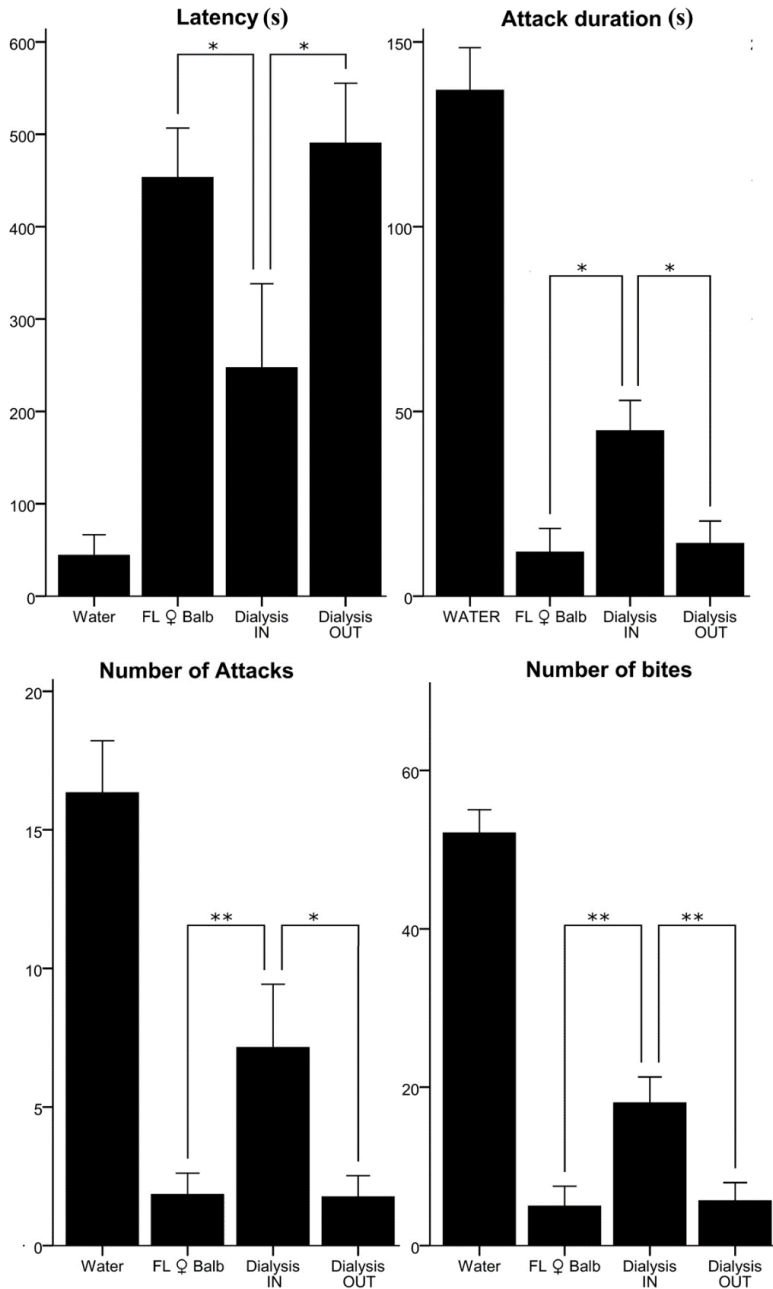


Figura 6: analisi preliminari relative alle dimensioni delle molecole lacrimali che inibiscono l'aggressività. L'analisi quantitativa dei parametri relativi al comportamento aggressivo dei topi CD1 residenti ($n = 7$) nei confronti di un intruso spennellato con il fluido lacrimale dializzato (out) e non dializzato (in). (Media \pm s.e.m.; $n = 7$; * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , ANOVA).

Recentemente sono stati identificati e purificati due steroidi solfati: la cortigenina e l'acido corticosteronico presenti a livello delle urine in grado di stimolare il comportamento sessuale dei maschi agendo attraverso l'attivazione del sistema vomeronasale (Fu et al., 2015). Ho ipotizzato che tali molecole potessero essere presenti anche nelle lacrime e influenzare l'effetto inibitorio osservato nei miei esperimenti. I risultati delle analisi di cromatografia liquida di spettrometria di massa (LC/MS) (Figura 7) hanno evidenziato la presenza di tali molecole nelle lacrime delle femmine mentre risultano quasi assenti nelle lacrime dei maschi. Tuttavia la loro concentrazione è 1000 volte inferiore rispetto a quella osservata nelle urine. Poiché l'urina, come citato precedentemente (Figura 2), diluita 1000 volte risulta inefficace nell'inibire l'aggressività e indurre un comportamento di monta nei maschi; pertanto è improbabile che tali molecole contribuiscano a evocare questo effetto.

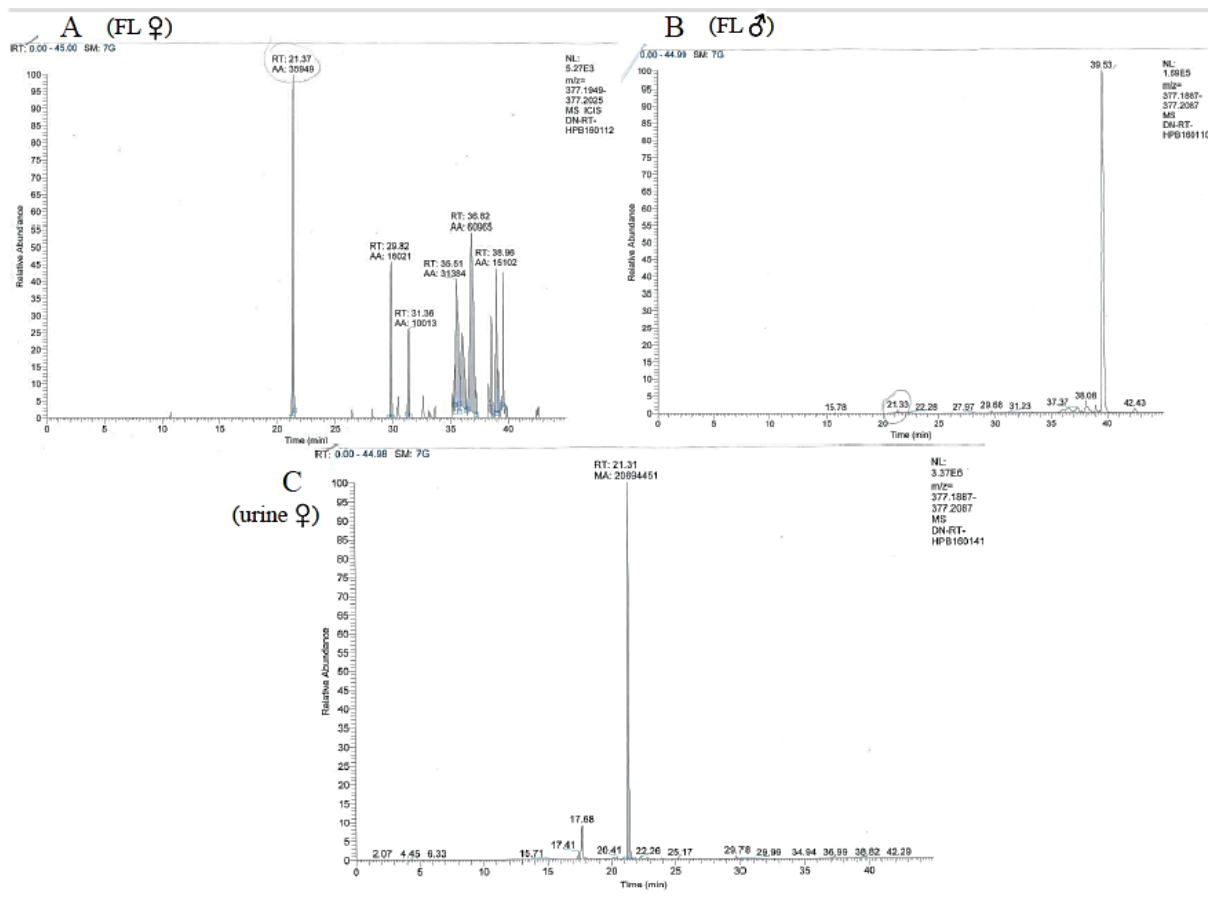


Figura 7: Cromatografia liquida di spettrometria di massa (LC/MS)

Spettri di massa della cortigenina (m/z 377) nel fluido lacrimale delle femmine (A); fluido lacrimale del maschio (B) e urine di femmina (C).

L'inibizione di specifiche regioni cerebrali è correlata ad una riduzione del comportamento aggressivo

Vista la natura prevalentemente non volatile delle molecole lacrimali inibenti l'aggressività, tali sostanze potrebbero agire attraverso il sistema vomeronasale. Infatti lavori precedenti suggeriscono che il VNO abbia un ruolo predominante nella rilevazione di molecole non volatili e nell'elaborazione di risposte comportamentali e fisiologiche (Tirindelli et al., 2009; Touhara et al., 2009). Infatti l'inattivazione genetica o l'ablazione dell'organo vomeronasale determina una significativa riduzione del comportamento aggressivo e sessuale tra conspecifici (Chamero et al., 2011; Stowers et al., 2002). Inoltre sono state già identificate molecole presenti sia nelle urine che nelle lacrime del maschio in grado di modulare il comportamento aggressivo e sessuale mediante l'attivazione del sistema vomeronasale (Chamero et al., 2007, Haga et al., 2010; Ferrero et al., 2013; Gomez et al., 2014). Il legame del ligando a livello di uno specifico recettore vomeronasale determina la trasduzione del segnale, la cui informazione viene trasmessa al bulbo olfattivo accessorio (AOB) che a sua volta invia efferenze ai nuclei dell'amigdala corticale mediale e postero mediale (che insieme formano l'amigdala mediale) (Dulac et al., 2016). L'amigdala mediale (Mea) rappresenta un centro importante per l'elaborazione delle informazioni provenienti dal sistema vomeronasale (Yang et al., 2014) che vengono trasmesse a livello dell'ipotalamo ventromediale (VMH) (Samuelsen et al., 2009; Swanson et al., 2000; Stowers et al., 2016). Studi di optogenetica hanno rilevato l'importanza del VMH nella regolazione dei diversi comportamenti sociali e il suo possibile coinvolgimento nel riconoscimento del genere (Anderson., 2012; Yang et al., 2013; Unger et al., 2015; Lee et al., 2014). Recentemente è stato identificato un sotto nucleo del VMH, la parte ventrolaterale, che risulta importante per la stimolazione del comportamento aggressivo nei topi maschi; il silenziamento di questa area sopprime il comportamento di attacco mentre la sua stimolazione promuove comportamenti aggressivi nei maschi anche a contatto con femmine o oggetti inanimati (Lee et al., 2014; Lin et al., 2011, Yang et al., 2013). Sebbene siano state identificate le aree cerebrali implicate nei

comportamenti aggressivi e sessuali, tuttavia non sono ancora noti i meccanismi neurali alla base dell'inibizione del comportamento aggressivo durante un' interazione tra conspecifici. A tale scopo, il mio modello sperimentale (maschio residente esposto al fluido lacrimale della femmina) si presta bene per fornire nuove informazioni riguardati questo argomento. Di conseguenza ho analizzato i livelli di espressione della proteina c-fos a livello delle aree cerebrali (MeA, VMHvl) implicate nella modulazione del comportamento aggressivo in residenti esposti a stimolo lacrimale.

In seguito "all'intermale aggression test" utilizzando intrusi spennellati con il fluido lacrimale della femmina, del maschio o acqua i topi residenti sono stati sacrificati e in seguito ad asportazione del cervello, esso è stato trattato per l'immunoreattività della proteina c-Fos (vedi metodi). Come controllo, un gruppo di animali è stato sacrificato in assenza di interazione sociale per valutare il livello basale della proteina c-Fos.

I risultati di immunofluorescenza indicano un'elevata attivazione dei livelli di c-Fos nel Mea di tutti i residenti esposti ai fluidi lacrimali di entrambi i sessi o acqua. Sebbene i fluidi lacrimali determinino un aumento di attivazione a livello del MeA probabilmente agendo attraverso il sistema vomeronasale, tuttavia non è stato possibile identificare delle specifiche aree attive in seguito a stimoli sesso-specifici. Questo suggerisce l'assenza di una possibile mappa topografica degli odori presente a livello del MeA.

Inoltre i risultati rilevano una sorprendente inattivazione del sottonucleo VMHvl in maschi residenti esposti al fluido lacrimale delle femmine rispetto ai residenti esposti al fluido lacrimale del maschio ($F = 0.03$, $p = 0.010$) o acqua ($F = 21.19$, $p = 0.003$).

Probabilmente l'inattivazione del nucleo VMHvl risulta correlata ad una inibizione del comportamento aggressivo modulata da molecole presenti nelle lacrime della femmina.

Inoltre è stato sorprendente notare l'inattivazione di un altro nucleo ipotalamico, il nucleo ipotalamico dorsomediale (DMH) in residenti esposti al fluido lacrimale delle femmine. Dai dati presenti in letteratura il DMH non presenta un ruolo evidente nella genesi del comportamento aggressivo; tuttavia risulta coinvolto nella regolazione di risposte fisiologiche, comportamentali (Dampney et al., 2008; Johnson et al., 2010), cardiovascolari e neuroendocrine (Dampney et al., 2008; Fontes et al., 2011 Bernardis

et al., 1998) durante una condizione di stress. Studi presenti in letteratura hanno dimostrato che, nei topi e nei ratti, lo stato di stress viene generato in seguito ad un comportamento aggressivo, che induce un aumento di corticosterone nel sangue, della frequenza cardiaca e della pressione sanguigna rispetto ad una condizione fisiologica (Tornatzky et al., 1998; Kruk et al., 2004; Sgoifo et al., 2004). Nei miei esperimenti i topi aggressivi mostrano un incremento di cellule c-Fos positive a livello del DMH probabilmente dovuto ad un aumento dello stato di stress in seguito ad “un intermale aggression test” (Figura 8). In contrasto tale attivazione non è stata osservata in maschi esposti al fluido lacrimale delle femmine, suggerendo una possibile influenza da parte di molecole lacrimali sesso-specifiche che porterebbero ad un mancato riconoscimento del genere.

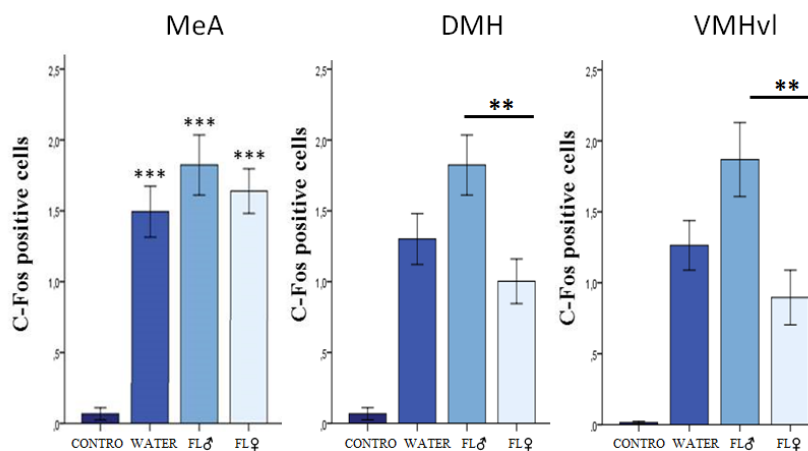
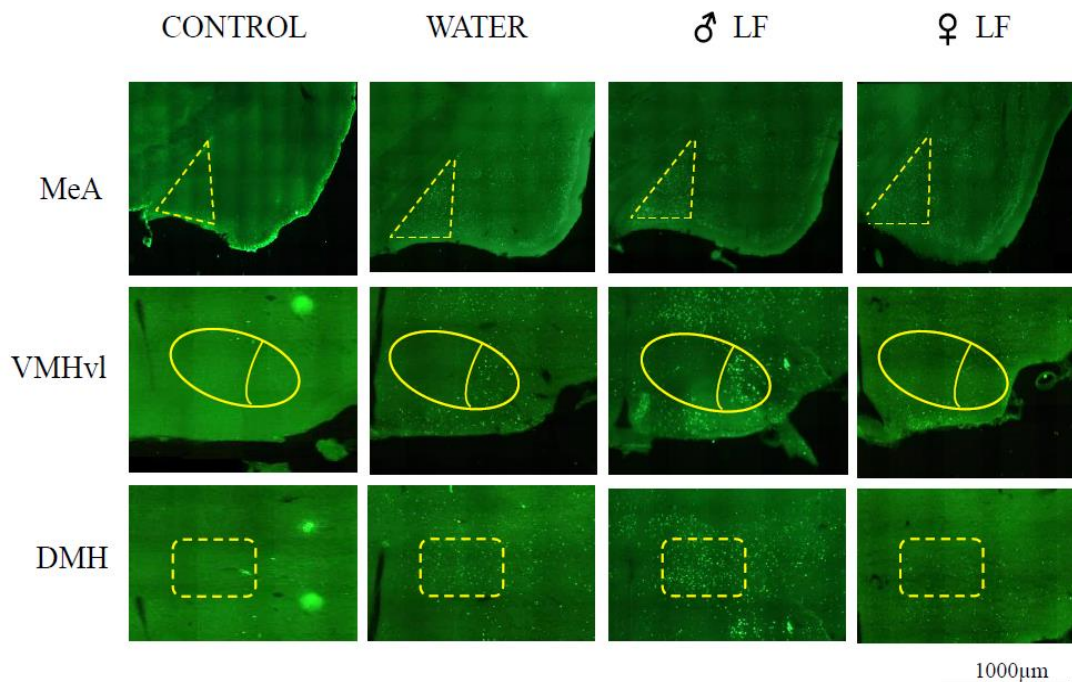


Figura 8: Cellule c-Fos positive nel Mea, VMHvl e DMH

Immunoreattività c-Fos nel Mea, VMHvl e DMH in maschi residenti esposti al fluido lacrimale di femmine, fluido lacrimale di maschi e acqua. Come controllo sono stati sacrificati gli animali in assenza di stimolo olfattivo.

Abbreviazioni: Amigdala mediale (Mea), parte ventrolaterale dell'ipotalamo ventromediale (VMHvl) nucleo dorsomediale dell'ipotalamo (DMH) (Media \pm s.e.m. ; n = 7; * \leq 0.05, ** \leq 0.01, ANOVA).

Il fluido lacrimale della femmina attiva specifici nuclei del sistema abenulare

Sebbene siano stati identificati i nuclei coinvolti nella stimolazione del comportamento aggressivo, tuttavia non sono ancora noti i meccanismi che modulano la componente motivazionale durante un comportamento aggressivo. In questo ambito recenti esperimenti hanno identificato il ruolo dell'abenula laterale nella modulazione dei comportamenti sociali, come l'aggressività (Golden et al., 2016).

L'abenula è una struttura anatomica complessa situata nella parte più caudale del talamo, e insieme alla ghiandola pineale, forma l'epitalamo. L'abenula è suddivisa in due nuclei ben definiti, l'abenula mediale (MHb) e l'abenula laterale (LHb). In particolare l'abenula laterale è coinvolta nell'elaborazione di informazioni di ricompensa e comportamenti di avversione, flessibilità cognitiva ed emozionale (Hikosaka et al., 2008; Zhao et al., 2015).

Una disfunzione a livello dell'LHb determina malattie mentali associate all'elaborazione maladattativa di stimoli di valenza positiva e negativa (Proulx et al., 2014) sviluppando alterazioni comportamentali (ad esempio lo sviluppo di un comportamento aggressivo maladattativo correlato ai disturbi neuropsichiatrici) (Golden et al., 2016).

Si nota un crescente interesse nel capire il ruolo dell'abenula laterale (LHb) nell'elaborazione della ricompensa, e nella regolazione dei comportamenti sociali. Anche se gli studi recenti hanno fatto progressi nella comprensione dell'organizzazione del circuito LHb, tuttavia i precisi meccanismi del suo coinvolgimento in questi comportamenti complessi sono in gran parte sconosciuti.

In una serie di eleganti esperimenti, Golden e colleghi identificano una proiezione GABAergica che collega il proencefalo (FB) all'abenula laterale che controlla in modo bidirezionale la valenza delle interazioni aggressive. Nello specifico, gli animali aggressivi esibiscono un incremento di attivazione a livello del proencefalo correlata ad una riduzione di attivazione di neuroni a livello dell'LHb. Questa attivazione sviluppa

una preferenza da parte degli animali verso un contesto associato alla presenza di un intruso sottomesso. In contrasto un'attivazione dell'abenula laterale stimola una condizione di avversione in animali non aggressivi (Golden et al 2016). Alla luce dei dati presenti in letteratura ho deciso di valutare l'attivazione neuronale dell'abenula laterale nel mio modello animale di inibizione del comportamento aggressivo mediato dal fluido lacrimale delle femmine. A tale scopo, maschi CD1 sono stati esposti ad intrusi spennellati con il fluido lacrimale della femmina, del maschio o acqua. I topi residenti sono stati sacrificati e in seguito ad asportazione del cervello, esso è stato trattato per l'immunoreattività della proteina c-Fos (vedi metodi). Come controllo, un gruppo di animali è stato sacrificato in assenza di interazione sociale per valutare il livello basale della proteina c-Fos.

I risultati mostrano che il fluido lacrimale delle femmine determina un'elevata attivazione a livello dell'abenula laterale rispetto ai gruppi di controlli (residenti esposti al fluido lacrimale del maschio o acqua) (Figura 9). Probabilmente nel fluido lacrimale delle femmine vi sono delle molecole in grado di attivare il circuito FB-LHb con successiva riduzione della motivazione nel compiere un atto violento

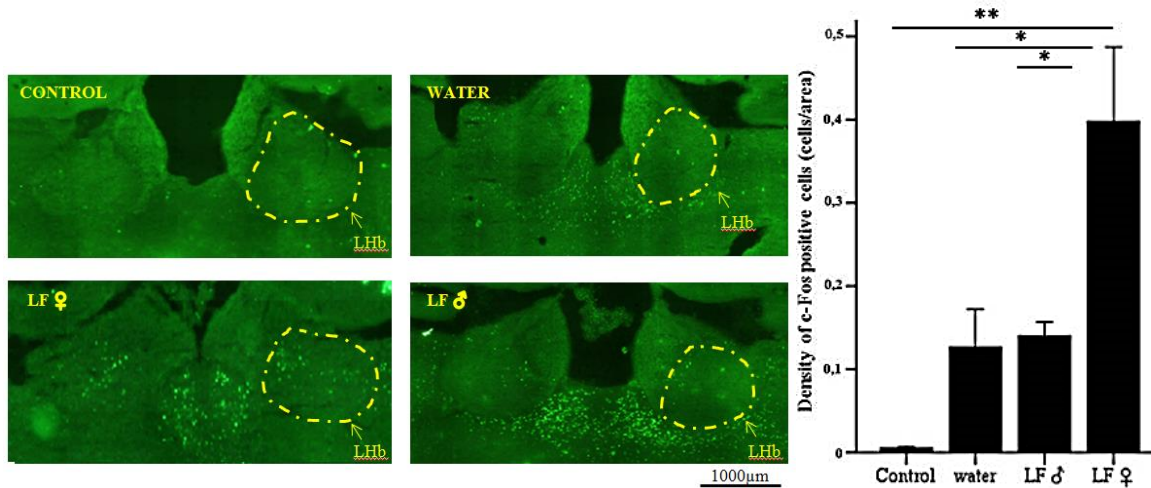


Figure 9: Il fluido lacrimale delle femmine attiva neuroni c-Fos nell' LHb.

Immunoreattività c-Fos nell' abenula laterale (LHb) in maschi residenti esposti al fluido lacrimale di femmine, fluido lacrimale di maschi e acqua. (Media \pm s.e.m. ; n = 7; * \leq 0.05, ** \leq 0.01, ANOVA).

6.DISCUSSIONE

Nel mio lavoro di tesi ho dimostrato l'influenza del fluido lacrimale delle femmine nella modulazione del comportamento aggressivo che normalmente viene esibito tra due maschi conspecifici. In particolar modo il fluido lacrimale delle femmine, spennellato sulla regione facciale, dorsale e anogenitale del maschio intruso prima di un "intermale aggression test", determina una riduzione drammatica del comportamento aggressivo del maschio residente. Questo effetto è probabilmente dovuto alla presenza di particolari molecole inibitorie nel fluido lacrimale delle femmine capaci di indurre una risposta differenziale nel maschio, mediante l'inibizione del comportamento aggressivo. È altresì possibile che nelle lacrime delle femmine vi siano delle sostanze in grado di interferire con i promotori del comportamento aggressivo secreti dall'intruso durante "l'intermale aggression test".

Studi precedenti hanno dimostrato che i chemosegnali che stimolano il comportamento aggressivo presenti sia nelle urine (MUP) ma anche nelle lacrime (ESP1), necessitano di altre informazioni prima di attivare o inibire uno specifico comportamento. Le MUP, spennellate su un maschio castrato (Mugford e Nowell, 1970) o femmine intatte recettive (Mucignat-Caretta et al., 1999b) stimolano l'aggressività, che al contrario viene inibita quando vengono spennellate sui cuccioli (Mucignat-Caretta et al., 2004). Questo effetto è dovuto alla presenza di molecole secrete dal cucciolo che interferiscono con i chemosegnali urinari ritardando il comportamento aggressivo. Allo stesso modo, nei miei esperimenti, è possibile che nelle lacrime delle femmine vi siano delle molecole che interferiscono con i chemosegnali che stimolano l'aggressività con sorprendente riduzione del comportamento violento da parte del residente. Le molecole presenti nelle lacrime delle femmine potrebbero indurre il residente a confondere il maschio intruso con una femmina, ritardando la latenza degli attacchi.

Tali molecole vengono prodotte a livello delle ghiandole extraorbitali, implicate nella produzione dei principali prodotti lacrimali. Questo è stato confermato da successivi esperimenti in cui il fluido lacrimale di femmine LGX (operate mediante asportazione

delle ghiandole extraorbitali), spennellato su un intruso, durante un “intermale aggression test”, mostra una riduzione significativa del suddetto effetto inibitorio. Questo ci porta ad ipotizzare che, sebbene risulti evidente un’implicazione della ghiandola extraorbitale nella produzione di tali molecole, la mancata abolizione dell’effetto inibitorio può essere attribuito ad una produzione complementare di tali sostanze da parte di altre ghiandole lacrimali (come ad esempio le ghiandole harderiane e sottomascellari). Inoltre è stato interessante notare che le lacrime prelevate da femmine intatte, non solo inibiscono l’aggressività ma stimolano il comportamento sessuale e di investigazione. Nello specifico, i residenti manifestavano un’elevata attrazione nei confronti di un maschio intruso con un incremento del comportamento di monta che normalmente viene esibito dal maschio nei confronti di una femmina recettiva. Si può ipotizzare che tale comportamento sia influenzato da molecole sesso specifiche presenti nelle lacrime che porterebbero ad un mancato riconoscimento di genere.

È noto che il maschio manifesta il comportamento di monta quasi esclusivamente in presenza di una femmina in estro. Per questo motivo ci siamo chiesti se la fase di estro abbia un ruolo rilevante nella produzione di queste molecole lacrimali. Sorprendentemente i miei esperimenti non hanno dimostrato differenze significative nelle diverse fasi del ciclo estrale. Tuttavia l’assenza delle ovaie ha influito fortemente sulla produzione di tali molecole inibitorie, tanto che il fluido lacrimale di femmine OVX (ovariectomizzate) era in grado di ridurre significativamente l’effetto di inibizione del comportamento aggressivo. Questo suggerisce che le ovaie ricoprono un ruolo importante nella produzione di molecole inibenti l’aggressività.

È infatti probabile che gli ormoni ovarici vadano a stimolare la produzione di molecole inibitorie da parte di altri organi secretori che riversano i loro prodotti nei diversi fluidi corporei come le urine o il fluido lacrimale delle femmine.

Per comprendere la natura chimica di queste molecole inibenti l’aggressività, ho effettuato una caratterizzazione preliminare mediante dialisi utilizzando membrane con cutoff di 2 kDa. I risultati dimostrano che si tratta di molecole non volatili di basso

peso molecolare che tuttavia risultano solo parzialmente dializzabili. Quest'ultimo dato può presentare diverse interpretazioni: in primo luogo, si potrebbe trattare di piccole molecole liposolubili che formando micelle e risultano difficili da dializzare; in alternativa nel fluido lacrimale ci potrebbero essere delle proteine in grado di legare tali molecole impedendone la dialisi. Infatti è noto che a livello dei fluidi corporei sono presenti proteine, lipocaline, in grado di legare molecole che influenzano aspetti fisiologici e comportamentali nel topo come l'estro (Marsden et al., 1964; Whitten et al., 1968; Jemiolo et al., 1986; Bacchini et al., 1992; Novotny et al., 1986;; Mucignat et al.,1995; Mucignat et al., 1998; Mucignat at al., 1999; Mucignat et al., 2002) e l'aggressività tra maschi (Novotny et al.,1985).

Vista la natura non volatile delle molecole lacrimali si può ipotizzare un coinvolgimento del sistema vomeronasale per il rilevamento di queste sostanze. Per questo motivo ho valutato l'attività delle aree cerebrali dell'asse vomeronasale implicate nell'induzione del comportamento aggressivo esponendo i residenti al fluido lacrimale di entrambi i sessi. I miei risultati mostrano un'elevata attivazione neuronale a livello dell'amigdala mediale (MeA) conseguenti alla stimolazione con le lacrime sia di maschio che di femmina; tuttavia non è stato possibile identificare delle sottoregioni amigdaliche differenzialmente attive in seguito a stimoli sesso-specifici. Coerentemente con i dati presenti in letteratura (Carvalho et al., 2015), possiamo ipotizzare che in un primo caso entrambi gli stimoli lacrimali (fluido lacrimale del maschio e fluido lacrimale della femmina) possano portare ad attivazione delle stesse cellule, in alternativa ogni stimolo lacrimale attiva cellule differenti che essendo sparse nel MeA non delineano una mappa topografica rendendo difficile la loro distinzione. Differenze significative, invece sono state evidenziate a livello del VMHvl un sub-nucleo che riveste un ruolo centrale nella genesi del comportamento aggressivo; il silenziamento di questa area sopprime il comportamento di attacco mentre la sua stimolazione promuove comportamenti aggressivi nei maschi anche a contatto con femmine o oggetti inanimati (Lee et al., 2014; Lin et al., 2011, Yang et al. 2013).

Nei miei esperimenti, i maschi esposti al fluido lacrimale di femmina presentano un numero ridotto di cellule neuronali c-Fos attive a livello del VMHvl se confrontate con residenti esposti al fluido lacrimale del maschio. Questo mi ha fatto ipotizzare che l'attivazione del Mea da parte delle molecole lacrimali della femmina stimolano a loro volta dei circuiti inibitori che fanno sinapsi a livello di VMHvl determinando un'inibizione del comportamento aggressivo.

Inoltre è stato interessante notare l'inattivazione di un altro nucleo ipotalamico, il nucleo ipotalamico dorsomediale (DMH) in residenti esposti al fluido lacrimale delle femmine. Il DMH è coinvolto nella regolazione di reazioni fisiologiche, comportamentali (Dampney et al., 2008; Johnson et al., 2010), cardiovascolari e neuroendocrine (Dampney et al., 2008; Fontes et al., 2011 Bernardis et al., 1998) durante una condizione di stress. Nei topi il comportamento aggressivo determina una cascata di alterazioni fisiologiche stress-correlate con effetti sul comportamento e sulle funzioni cardiache e neuroendocrine (Tornatzky et al., 1998; Kruk et al., 2004; Sgoifo et al., 2004). Nei miei esperimenti i maschi aggressivi mostrano un incremento di cellule c-Fos positive a livello del DMH probabilmente a causa di un aumento dello stato di stress in seguito ad “un' intermale aggression test”. In contrasto tale attivazione non è stata osservata in maschi esposti al fluido lacrimale delle femmine suggerendo una possibile influenza da parte di molecole lacrimali sesso-specifiche che porterebbero ad un mancato riconoscimento del genere.

Viceversa il fluido lacrimale della femmina è in grado di attivare un'altra area cerebrale quale l'abenula laterale. In particolare l'abenula laterale (LHb) è coinvolta nell'elaborazione di informazioni di ricompensa e comportamenti di avversione, flessibilità cognitiva ed emozionale (Hikosaka et al., 2008; Zhao et al., 2015).

Una disfunzione a livello dell'LHb determina malattie mentali associate all'elaborazione maladattativa di stimoli di valenza positiva e negativa (Proulx et al., 2014) sviluppando alterazioni comportamentali (ad esempio lo sviluppo di un comportamento aggressivo maladattativo correlato ai disturbi neuropsichiatrici) (Golden et al., 2016).

L'LHb , pur non essendo direttamente coinvolto nella genesi del comportamento aggressivo, tuttavia risulta coinvolta nella valenza di un comportamento violento.

In una serie di eleganti esperimenti, Golden e colleghi identificano una proiezione GABAergica che collega il proencefalo (FB) all'abenula laterale che controlla in modo bidirezionale la valenza delle interazioni aggressive. Nello specifico, gli animali aggressivi esibiscono un incremento di attivazione a livello del proencefalo correlata ad una minore attivazione di neuroni a livello dell'LHb. Questa condizione genera una preferenza da parte degli animali verso un contesto associato alla presenza di un intruso sottomesso. In contrasto un'attivazione dell'abenula laterale stimola una condizione di avversione in animali non aggressivi (Golden et al 2016). Nel mio modello animale, di inibizione dell'aggressività mediato dal fluido lacrimale delle femmine ho osservato un' elevata attivazione a livello dell'abenula laterale rispetto ai gruppi di controlli (residenti esposti al fluido lacrimale del maschio o acqua). L'attivazione o l'inibizione dei circuiti FB-LHb risultano correlati alla motivazione nel compiere un atto violento in relazione al sesso del conspecifico durante le interazioni sociali.

7.BIBLIOGRAFIA

- Ache, B. W., and Young, J. M. (2005).** “Olfaction: diverse species, conserved principles”. *Neuron*; 48, 417–430.
- Alema, G. S., Maccari, S., Micci, M. A., and Patacchioli, F. R. (1988).** Hippocampal serotonin in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis (HPAA) stress response. *Pharmacol. Res. Commun.* 20, 429–430.
- AN Clancy, A Coquelin, F Macrides, RA Gorski and EP Noble (1984).** “Sexual behavior and aggression in male mice: involvement of the vomeronasal system”..*Journal of Neuroscience*; 4 (9), 2222-2229.
- Anderson D. J.(2012).** “Optogenetics, sex and violence in the brain: implications for psychiatry”. *Biol Psychiatry*; 71(12): 1081–1089.
- Antonia Sophocleousa, and Aymen I Idris (2014).** “Rodent models of osteoporosis”. *Bonekey Rep.*; 3: 614.
- Bacchini A, Gaetani E, Cavaggioni A. (1992).** “Pheromone binding proteins of the mouse, *Mus musculus*”. *Experientia* 48: 419–421,
- Bailey TW, Dimicco JA Am J (2001).** “Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats”. *Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 280(1):R8-15.
- Baum, M. J. (2012).** “Contribution of pheromones processed by the main olfactory system to mate recognition in female mammals”. *Front. Neuroanat*; 6:20.
- Bellver C.P., Moretti B.C., Novejarque, A.García F.M and Lanuza E. (2012).** “Differential efferent projections of the anterior, posteroventral, and posterodorsal subdivisions of the medial amygdala in mice”. *FrontiersinNeuroanatomy*; 6:33.

- Bernardis LL, Bellinger LL (1998).** "The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update". *Proc Soc Exp Biol Med. Sep*; 218(4):284-306.
- Beynon RJ, Hurst JL. (2004).** "Urinary proteins and the modulation of chemical scents in mice and rats". *Peptides* 25: 1553–1563,
- Bocskei Z, Groom CR, Flower DR, Wright CE, Phillips SE, Cavaggioni A, Findlay JB, North AC. (1992).** "Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography". *Nature* 360: 186–188,
- Brennan, P. A., and Zufall, F. (2006).** "Pheromonal communication in vertebrates". *Nature*; 444, 308–315.
- Canteras NS, Chiavegatto S, Ribeiro do Valle LE, Swanson LW. (1997).** "Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions". *Brain Res Bull.*;44:297–305.
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1992).** "Projections of the ventral premammillary nucleus.". *J Comp Neurol.* Oct 8; 324(2):195-212.
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1995).** "Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat". *J Comp Neurol.* Sep 18; 360(2):213-45.
- Canteras NS. (2002).** "The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications". *Pharmacol Biochem Behav.*;71:481–491.
- Carlos Stocco (2008)** "Aromatase Expression in the Ovary: Hormonal and Molecular Regulation". *Steroids.*; 73(5): 473–487.
- Cavaggioni A, Mucignat-Caretta C. (2000).** "Major urinary proteins, alpha(2U)-globulins and aphrodisin". *Biochim Biophys Acta* 1482: 218–228.

- Chamero P., Marton T.F., Logan D.W., Flanagan K., Cruz J.R., Saghatelian A., Cravatt B.F., Stowers L. (2007).** "Identification of protein pheromones that promote aggressive behavior". *Nature*.;450:899–902.
- Christensen A., Bentley G. E., Cabrera R., Ortega H. H., Perfito N., Wu T. J., Micevych P. (2012).** "Hormonal Regulation of Female Reproduction". *Horm Metab Res.*; 44(8): 587–591.
- Connor JL, Lynds PG. (1977).** "Mouse aggression and the intruder-familiarity effect: evidence for multiple-factor determination C57bl". *J Comp Physiol Psychol* 91: 270–280.
- Dampney RA, Horiuchi J, McDowall LM (2008).** "Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behavior". *Auton Neurosci.*; 142(1-2):3-10.
- Del Punta K, Leinders-Zufall T, Rodriguez I, Jukam D, Wysocki CJ, Ogawa S, Zufall F, Mombaerts P (2002).** "Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes". *Nature* 419: 70–74.
- Dixon A. K. & Mackintosh J. H. (1971).** "Effect of female urine upon the social behaviour of adult male mice". *Anim.Behav.*,19,138-140.
- Donato J Jr, Cavalcante JC, Silva RJ, Teixeira AS, Bittencourt JC, Elias CF (2010).** "Male and female odors induce Fos expression in chemically defined neuronal population". *Physiol Behav.* Jan 12; 99(1):67-77.
- Dulac C, Axel R (1995).**"A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals". *Cell.* 20; 83(2):195-206.
- Dulac C, Kimchi T (2007).** "Neural mechanisms underlying sex-specific behaviors in vertebrates." *Curr Opin Neurobiol.*;17(6):675-83.

- Dulac, C. and Wagner, S. (2006).** “Genetic analysis of brain circuits underlying pheromone signaling”. *Annu. Rev. Genet.*; 40: 449–467.
- Dulac, C., and Torello, A. T. (2003).** “Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behavior”. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 551–562.
- Falkner AL, Dollar P, Perona P, Anderson DJ, Lin D (2014).** “Decoding ventromedial hypothalamic neural activity during male mouse aggression”. *J Neurosci.* Apr 23; 34(17):5971-84.
- Ferrero DM, Moeller LM, Osakada T, Horio N, Li Q, Roy DS, Cichy A, Spehr M, Touhara K, Liberles SD. (2013)** “A juvenile mouse pheromone inhibits sexual behaviour through the vomeronasal system”. *Nature* 502(7471):368-71.
- Firestein S. (2001)** “How the olfactory system makes sense of scents”. *Nature*; 413 (6852):211 – 218.
- Fontes MA, Xavier CH, de Menezes RC, Dimicco JA (2011).** “The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress”. *Neuroscience.* Jun 16; 184():64-74.
- Fu X, Yan Y, Xu PS, Geerlof-Vidavsky I, Chong W, Gross ML, Holy TE: (2015)** “A Molecular code for identity in the vomeronasal system” *Cell*,163:313-323.
- Golden S.A., M. Heshmati, M. Flanigan, D.J. Christoffel, K. Guise, M.L. Pfau, S.J. Russo (2016).** “ Basal forebrain projections to the lateral . modulate aggression reward”. *Nature*, 534 (2016), pp. 688-692.
- Haga S., Hattori T., Sato T., Sato K., Matsuda S., Kobayakawa R., et al. (2010).** “The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor”. *Nature* 466(7302):118-22.
- Hashikawa K., Hashikawa Y., Tremblay R., Zhang J., Feng JE., Sabol A., Piper WT., Lee H., Rudy B., Lin D. (2017).** “Esrl+ cells in the ventromedial

hypothalamus control female aggression”. *Nat Neurosci.* Nov; 20(11):1580-1590.

He J., Ma L., Kim S., Nakai J., Yu C.R. (2008).”Encoding gender and individual information in the mouse vomeronasal organ”. *Science.*;320:535–38.

Herkenam M., Nauta W.J. (1979). “Efferent connections of the habenular nuclei in the rat”. *J. Com. Neurol.* 187, 19-47.

Herrada G, Dulac C (1997). “A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution”. *Cell.* 22; 90(4):763-73.

Hikosaka O., Sesack S.R., Lecourtier L., Shepard P.D. (2008). “Habenula: crossroad between the basal ganglia and the limbic system”. *JNeurosci.*, 12; 28(46):11825-9.

Hirakane M, Taniguchi M, Yoshinaga S, Misumi S, Terasawa H (2014) “Expression and purification of mouse peptide ESP4 in *Escherichia coli*”. *Protein Expr Purif.* ;96:20-5.

Hkosaka O., (2010). “The habenula:from stress evasion to value-based decision-making”. *Nat. Rev. Neurosci* 11, 503-513.

Holy T.E., Dulac C., Meister M. (2000).”Responses of vomeronasal neurons to natural stimuli”. *Science.*;289:1569–72.

Hull EM, Dominguez JM (2007). “Sexual behavior in male rodents”. *Horm Behav* 52: 45–55.

Hurst JL, Beynon RJ. (2004) .”Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice”. *Bioessays* 26: 1288–1298,

Hyopil Kim, Junehee Son, Hyoungseob Yoo, Hakyoo Kim, Jihae Oh, Dae Hee Han, Yoon Hwang, and Bong-Kiun Kaang (2016). “Effects of the Female

Estrous Cycle on the Sexual Behaviors and Ultrasonic Vocalizations of Male C57BL/6 and Autistic BTBR T+ tf/J Mice”. 25(4): 156–162.

Ingersoll DW, Weinhold LL. (1987) “Modulation of male mouse sniff, attack, and mount behaviors by estrous cycle-dependent urinary cues”. *Behav Neural Biol.*;48:24–42.

Ishii K.K., Takuya Osakada, Hiromi Mori, Nobuhiko Miyasaka, Yoshihiro Yoshihara, Kazunari Miyamichi, Kazushige Touhara. (2017) “A Labeled-Line Neural Circuit for Pheromone-Mediated Sexual Behaviors in Mice”. *Neuron* 95,123-137.

Jemiolo B, Harvey S, Novotny M. (1986). “Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents”. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4576–4579.

Jemiolo, B., Alberts, J., Sochinski-Wiggins, S., Harvey, S., and Novotny, M. (1985). Behavioural and endocrine responses of female mice to synthetic analogues of volatile compounds in male urine. *Anim. Behav.* 33, 1114–1118.

Jemiolo, B., Xie, T. M., and Novotny, M. (1991). “Socio-sexual olfactory preference in female mice: attractiveness of synthetic chemosignals”. *Physiol. Behav.* 50, 1119–1122.

Jemiolo, B., Xie, T., and Novotny, M. (1992). “Urine marking in male mice: responses to natural and synthetic chemosignals”. *Physiol. Behav.* 52, 521.

Jhou T.C., Fields H.L., Baxter M.G., Saper C.B., Holland P.C. (2009). “ The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses”. *Neuron.*, 61, 786-800.

- Johnson PL, Truitt W, Fitz SD, Minick PE, Dietrich A, Sanghani S, Träskman-Bendz L, Goddard AW, Brundin L, Shekhar A (2010).** "A key role for orexin in panic anxiety". *Nat Med.* Jan; 16(1):111-5.
- Kaufling J., Veinante P., Pawlowski S.A., Freud-Mercier M.J., Barrot M. (2009).** "Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat". *J. Comp. Neurol.* 513,597-621.
- Keim SR, Shekhar A (1996).** "The effects of GABAA receptor blockade in the dorsomedial hypothalamic nucleus on corticotrophin (ACTH) and corticosterone secretion in male rats". *Brain Res.* Nov 11; 739(1-2):46-51.
- Keller M, Pierman S, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J (2006).** "The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice". *Eur J Neurosci* 23: 521–530.
- Kim U., Lee T. (2012).** "Topography of descending projections from anterior insular and medial prefrontal regions to the lateral habenula of the epithalamus in the rat". *Eur J Neurosci.*; 35(8):1253-69.
- Kimchi T, Xu J, Dulac C (2007).** "A functional circuit underlying male sexual behaviour in the female mouse brain". *Nature.* Aug 30; 448(7157):1009-14.
- Kimoto H., Sato K., Nodari F., Haga S., Holy T.E., Touhara K. (2007).** "Sex and strain-specific expression and vomeronasal activity of mouse ESP family peptides". *Curr. Biol.*;17:1879–84.
- Kimoto, H. & Touhara, K. (2005).** "Induction of c-Fos expression in mouse vomeronasal neurons by sex-specific non-volatile pheromone(s)". *Chem. Senses* , 30,146–147.
- Kimoto, H. S. (2007).** "Sex- and strain-specific expression and vomeronasal activity of mouse ESP family peptides". *Curr Biol*, 17,1879-1884.

- Kimoto, H., Haga, S., Sato, K., and Touhara, K. (2005).** “Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons”. *Nature*, 437, 898-901.
- Lecourtier L., Kelly P.H.A. (2007).** “ A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenula complex in monoamine transmission and cognition. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31,658-672.
- Lee, H., Kim, D.-W., Remedios, R., Anthony, T.E., Chang, A., Madisen, L., Zeng, H., and Anderson, D.J. (2014).** “Scalable control of mounting and attack by *Esr1*+ neurons in the ventromedial hypothalamus”. *Nature.*; 509: 627–632.
- Leinders-Zufall T., Brennan P., Widmayer P., Chandramani P.S., Maul-Pavicic A., Jäger M., Li X.-H., Breer H., Zufall F., Boehm T. (2004).**”MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ”. *Science.*;306:1033–37.
- Leinders-Zufall T., Lane A.P., Puche A.C., Ma W., Novotny M.V., Shipley M.T., Zufall F. (2000).** “Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons”. *Nature.*;405:792–96.
- Leybold BG, Yu CR, Leinders-Zufall T, Kim MM, Zufall F, Axel R (2002).**“Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice.” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(9):6376-81.
- Lin, D. et al. (2011).** “Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus”. *Nature* 470, 221–226 .
- Lin, D. Y., Zhang, S. Z., Block, E., and Katz, L. C. (2005).** Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature* 434, 470–477.
- Lledo PM, Gheusi G, Vincent JD (2005).** “Information processing in the mammalian olfactory system”. *Physiol Rev.*85 (1):281 – 317.

- Logan DW, Marton TF, Stowers L. (2008).** “Species specificity in major urinary proteins by parallel evolution”. *PLoS ONE* 3: e3280,
- Ma M. (2007).** “Encoding olfactory signals via multiple chemosensory systems”. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*;42:463–480.
- Ma W, Miao Z, Novotny MV. (1998).**”Role of the adrenal gland and adrenal-mediated chemosignals in suppression of estrus in the house mouse: the lee-boot effect revisited”. *Biol Reprod* 59: 1317–1320.
- Mandiyani VS, Coats JK, Shah NM (2005).**”Deficits in sexual and aggressive behaviors in *Cnga2* mutant mice”. *Nat Neurosci.*; 8(12):1660-2.
- Maruniak JA, Wysocki CJ, Taylor JA (1986).** “Mediation of male mouse urine marking and aggression by the vomeronasal organ”. *Physiol Behav* 37: 655–657.
- Matsumoto M., Hikosaka O. (2007).** “Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons.” *Nature.* 28; 447(7148):1111-5.
- Matsunami H, Buck LB (1997).**“A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals”. *Cell.* 22; 90(4):775-84.
- McClintock MK. (1998).** “On the nature of mammalian and human pheromones.”. *Ann NY Acad Sci* 855: 390–392.
- McLean AC1, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA. (2012).** “Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification.”. *J Vis Exp.* 2012 Sep 15;(67):e4389. doi: 10.3791/4389.
- McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S. & Bennett, S. A. (2012).** “Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification”. *J. Vis. Exp* 67, e4389

- Mombaerts P (1999).** “Seven – transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors”. *Science.*; 286 (5440): 707 – 11.
- Mucignat-Caretta, C. And Caretta, A. (1999b).** Chemical signals in male house mice urine: Protein bound molecules modulate interaction between sexes. *Behaviour* 136:331–343.
- Mucignat-Caretta, C., Caretta, A. (1999).** “Urinary chemical cues affect light avoidance behaviour in male laboratory mice, *Mus musculus*”. *Anim Behav.*; 57 (4):675–769.
- Mucignat-Caretta, C., Caretta, A., and Baldini E. (1998).** “Protein-bound male urinary pheromones: differential responses according to age and gender”. *Chem Senses.*; 23 (1):67–70.
- Mucignat-Caretta, C., Caretta, A., and Cavaggioni, A. (1995).** “Acceleration of puberty onset in female mice by male urinary proteins”. *J. Physiol.* 486(pt 2), 517–522.
- Mucignat-Caretta, C., Caretta. (2002).** “Modulation of Exploratory Behavior in Female Mice by Protein-Borne Male Urinary Molecules”. *J. Chem. Ecol.*; 28 (9):1853–1863.
- Mugford, R. A. & Nowell, N. W. (1970).** “Pheromones and their effect on aggression in mice”. *Nature* 226, 967–968.
- Munger S.D., Leinders–Zufall T., Zufall F. (2009).** “Subsystem organization of the mammalian sense of smell ”. *Annu Rev Physiol.* 2009; 71():115-40.
- Nodari F., Hsu F.F., Fu X., Holekamp T.F., Kao L.F., Turk J., Holy T.E. (2008).** “Sulfated steroids as natural ligands of mouse pheromone-sensing neurons”. *J. Neurosci.*;28:6407–18.

- Norlin EM, Gussing F, Berghard A (2003).** “Vomeronasal phenotype and behavioral alterations in G alpha i2 mutant mice”. *Curr Biol.* Jul 15; 13(14):1214-9.
- Novotny M, Harvey S, Jemiolo B, Alberts J. (1985)** “Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice”. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2059–2061.
- Novotny M.V. (2003)** “Pheromones, binding proteins and receptor responses in rodents”. *Biochem. Soc. Trans.*;31:117–22.
- Novotny MV, Ma W, Wiesler D, Zidek L. (1999).** “Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein”. *Proc Biol Sci* 266: 2017–2022.
- Novotny, M., Harvey, S., and Jemiolo, B. (1990).** “Chemistry of male dominance in the house mouse, *Mus domesticus*”. *Experientia* 46, 109–113.
- Oboti L., Pérez-Gómez A., Keller M., Jacobi E., Birnbaumer L., Leinders-Zufall T., et al. (2014).** “A wide range of pheromone-stimulated sexual and reproductive behaviors in female mice depend on G protein G (alpha) o”. *BMC Biol.* 12:31 10.1186/1741-7007-12-31.
- Omelchenko N., Bell R., Sesack S.R. (2009).** “ Lateral habenula projection to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area”. *Eur. J. Neurosci.* 30, 1239-1250.
- Papes F, Logan DW, Stowers L (2010).**”The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs”. *Cell.*; 141(4):692-703.
- Pardo-Bellver C, Cádiz-Moretti B, Novejarque A, Martínez-García F, Lanuza E (2012).** “Differential efferent projections of the anterior, posteroventral, and

posterodorsal subdivisions of the medial amygdala in mice”. *Front Neuroanat.*; 6():33.

Parmigiani S, Palanza P, Rodger J, Ferrari PF (1999). “Selection, evolution of behavior and animal models in behavioral neuroscience”. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23 (1999) 957–970.

Peter Karlson e Martin Lüscher. (1959).“Pheromones: a new term for a class of biologically active substances ”. *Nature* 183: 55 – 56, 27.

Pfaff DW, Sakuma Y (1979).“ Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. ”. *J Physiol.* Mar; 288():203-10.

Potter E.S., Willis L.R. and Di Micco JA (1996). “Muscimol acts in dorsomedial but not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress” *Journal of Neuroscience.*; 16 (3) 1173-1179.

Proulx C.D., Hikosaka O., Malinow R. (2014). “Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors”. *Nat Neurosci.*; 17(9):1146-52.

Roberts S. A., Simpson D. M., Armstrong S. D., Davidson A. J., Robertson D. H., McLean L., Beynon R. J., Hurst J. L. (2010). “Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour”. *BMC Biol.* 8:75 10.1186/1741-7007-8-75.

Ronnett GV, Moon C. (2002). “G proteins and olfactory signal transduction”. *Annu. Rev. Physiol.*; 64: 189 – 222.

Roppolo D, Ribaud V, Jungo V.P, Luscher C, Rodriguez I (2006). “Projection of the Gruneberg ganglion to the mouse olfactory bulb”. *Eur J Neurosci.*;23:2887–2894.

- Ryba NJ, Tirindelli R . (1997).** “A new multigene family of putative pheromone receptors”. *Neuron.*; 19(2):371-9.
- Samuelsen CL, Meredith M (2009).** “Categorization of biologically relevant chemical signals in the medial amygdala”. *Brain Res. Mar 31; 1263()*:33-42.
- Sbarbati A, Osculati F. (2006)** .“Allelochemical communication in vertebrates: kairomones, allomones and synomone”. *Cells Tissues Organs* 183: 206 – 219.
- Shahan K, Denaro M, Gilmartin M, Shi Y, Derman E. (1987).** “Expression of six mouse major urinary protein genes in the mammary, parotid, sublingual, submaxillary, and lachrymal glands and in the liver”. *Mol Cell Biol* 7: 1947–1954,
- Soden ME, Miller SM, Burgeno LM, Phillips PEM, Hnasko TS, Zweifel LS (2016).** “Genetic Isolation of Hypothalamic Neurons that Regulate Context-Specific Male Social Behavior”. *Cell Rep.* Jul 12; 16(2):304-313.
- Stowers L, Holy TE, Meister M, Dulac C, Koentges G. (2002).** “Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2”. *Science* 295: 1493–1500.
- Stowers L., Liberles S.D. (2016)** . “State-dependent responses to sex pheromones in mouse”. *Current Opinion in Neurobiology*, 38:74–79.
- Suárez R, García-González D, De Castro F. (2012).** “Mutual influences between the main olfactory and vomeronasal systems in development and evolution”. *Frontiers in neuroanatomy* 6, 50.
- Swanson LW (2000).** “Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior”. *Brain Res. Dec 15; 886(1-2)*:113-164
- Tali Kimchi, Jennings Xu & Catherine Dulac. (2007)** “Functional circuit underlying male sexual behaviour in the female mouse brain”. *Nature*; 448, 1009–1014

- Tatsuya Hattori, Takuya Osakada, Ayaka Matsumoto, Naoki Matsuo, Sachiko Haga-Yamanaka, Takaya Nishida, Yuji Mori, Kazutaka Mogi, Kazushige Touhara and Takefumi Kikusui (2016).** “Self-Exposure to the Male Pheromone ESP1 Enhances Male Aggressiveness in Mice”. *Current Biology* 26, 1229–1234.
- Tirindelli R., Dibattista M., Pifferi S., Menini A. (2009).** “From Pheromones to Behavior”. *Physiol Rev* 89: 921–956.
- Tornatzky W, Cole JC, Miczek KA (1998).** “Recurrent aggressive episodes entrain ultradian heart rate and core temperature rhythms”. *Physiol Behav.* Mar; 63(5):845-53.
- Touhara K. (2007).** “Molecular Biology of Peptide Pheromone Production and Reception in Mice”. *Adv Genet.*;59:147-71.
- Touhara, K. and Vosshall, L.B. (2009).** “Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors”. *Annu. Rev. Physiol.*; 71: 307–332.
- Trotier D. (2011).** “Vomer nasal organ and human pheromones”. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.*; 128(4):184-90.
- Unger, E. K. et al. (2015).** “Medial amygdalar aromatase neurons regulate aggression in both sexes”. *Cell Reports* 10, 453–462.
- Vandenbergh, J.G., (1969).** “Male odor accelerates female sexual maturation in mice”. *Endocrinology* 84, 658 – 660.
- Wang Z, Balet SC, Li V, Nudelman A, Chan GC, Storm DR. (2006).** “Pheromone detection in male mice depends on signaling through the type 3 adenylyl cyclase in the main olfactory epithelium”. *J Neurosci* 26: 7375–7379.
- Wang Z, Balet Sindreu C, Li V, Nudelman A, Chan GC, Storm DR J (2006).** “Pheromone detection in male mice depends on signaling through the

type 3 adenylyl cyclase in the main olfactory epithelium”. *Neurosci.* Jul 12; 26(28):7375-9.

Whitten, W.K., (1959). “Occurrence of anoestrus in mice caged in groups”. *J. Endocrinol.* 18, 102 – 107.

Yang T, Yang CF, Chizari MD, Maheswaranathan N, Burke KJ Jr, Borius M, Inoue S, Chiang MC, Bender KJ, Ganguli S, Shah NM (2017). “Social Control of Hypothalamus-Mediated Male Aggression.”. *Neuron.* Aug 16; 95(4):955-970.e4.

Yang, C.F., Chiang, M.C., Gray, D.C., Prabhakaran, M., Alvarado, M., Juntti, S.A., Unger, E.K., Wells, J.A., and Shah, N.M.. (2013). “Sexually dimorphic neurons in the ventromedial hypothalamus govern mating in both sexes and aggression in males”. *Cell.*; 153: 896–909.

Yoshikawa, K., Nakagawa, H., Mori, N., Watanabe, H., and Touhara, K. (2013). “An unsaturated aliphatic alcohol as a natural ligand for a mouse odorant receptor”. *Nat. Chem. Biol.* 9, 160–162.

Zhao H., Zhang B.L., Yang S.J., Rusak B. (2015). “The role of lateral habenula-dorsal raphe nucleus circuits in higher brain functions and psychiatric illness”. *Behav Brain Res.* 15; 277: 89-98.